

Université de Montréal

**Développement de méthodes d'analyse de standards pharmaceutiques
par électrophorèse capillaire**

par
Marie-Eve Léonard Charette

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en chimie

Août 2006

©, Marie-Eve Léonard Charette, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Développement de méthodes d'analyse de standards pharmaceutiques
par électrophorèse capillaire**

présenté par :

Marie-Eve Léonard Charette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....
Françoise Winnik : présidente-rapporteuse

.....
Karen C. Waldron : directrice de recherche

.....
Dominic Rochefort : membre du jury

SOMMAIRE

Les méthodes d'analyse par électrophorèse capillaire offrent plusieurs avantages par rapport à la chromatographie liquide à haute performance. Elles permettent d'obtenir des pics dont l'efficacité (N) est supérieure par la présence d'un profil de migration plat dans le capillaire. De plus, ces méthodes sont rapides et entraînent une consommation moindre d'analytes et de solvant. Des méthodes de séparation de plusieurs catégories de standards pharmaceutiques ont été développées par électrophorèse capillaire de zone (ÉCZ) et électrophorèse capillaire électrocinétique (ÉCÉ). L'objectif visé était de développer des méthodes satisfaisantes pour le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada, leur objectif étant de qualifier et de quantifier les produits pharmaceutiques disponibles au Canada. Les standards pharmaceutiques présentés dans ce mémoire incluent des antiviraux, des antibiotiques, des analgésiques, des barbituriques, des sennosides et les énantiomères du valsartan pour un total de 31 composés. Les interactions entre les échantillons et les constituants dans le capillaire ont été évaluées pour chacune de ces catégories. Le mode de séparation sélectionné (ÉCZ ou ÉCÉ) dépendait des caractéristiques structurales des drogues de chaque catégorie. Les effets des divers paramètres expérimentaux sur la séparation de ces drogues ont été étudiés et maximisés. Les paramètres analytiques des méthodes développées ont alors pu être déterminés pour chacune des familles de composés. La quantification du valsartan et des sennosides provenant de produits commerciaux a également été effectuée.

Mots clés : électrophorèse capillaire, maximisation, standards pharmaceutiques, quantification.

ABSTRACT

Capillary electrophoresis methods offer several advantages when compared to high performance liquid chromatography such as a better peak shape (N) because of the flat flow profile in the capillary, rapid separation, smaller quantities needed for analysis and minimal solvent consumption. Separation methods were developed by capillary zone electrophoresis (CZE) and electrokinetic capillary chromatography (ECK) for several categories of drug standards. The intended objective was to develop methods suitable for the pharmaceutical laboratory of Health Canada, whose goal is to qualify and to quantify the pharmaceutical products available in Canada. The pharmaceutical standards presented in this thesis include antivirals, antibiotics, analgesics, barbiturates, sennosides and the enantiomers of valsartan for a total of 31 compounds. The interactions between the samples and constituents in the capillary were evaluated for each of these categories. The mode selected (CZE or EKC) for the separation depended on the structural characteristics of each drug within a given category. The effects of various experimental parameters on the separation of these drugs were studied and maximized. The analytical figures of merit of the developed methods were then determined for each family of compounds. Quantification of valsartan and sennosides from commercially available products has also been done.

Key words : capillary electrophoresis, maximization, drug standards, quantification.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	1
1.1 Développement de méthodes par électrophorèse capillaire	1
1.2 Méthodologie	2
1.3 Électrophorèse capillaire de zone	2
1.4 Techniques électrophorétiques	4
1.5 Détection en électrophorèse capillaire	7
1.6 Paramètres analytiques	8
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE	14
2.1 Instrumentation et réactifs	14
2.2 Manipulations communes	15
3. SÉPARATION DE BARBITURIQUES	20
3.1 Introduction	20
3.2 Partie expérimentale	22
3.3 Résultats et discussion	22
3.4 Conclusion	29
4. SÉPARATION D'ANTIVIRAUX	30
4.1 Introduction	30
4.2 Partie expérimentale	33
4.3 Résultats et discussion	33
4.4 Conclusion	40
5. SÉPARATION DE TÉTRACYCLINOÏDES	42
5.1 Introduction	42
5.2 Partie expérimentale	44
5.3 Résultats et discussion	45
5.4 Conclusion	54

	vi
6. SÉPARATION DE PÉNICILLINES	55
6.1 Introduction	55
6.2 Partie expérimentale	57
6.3 Résultats et discussion	58
6.4 Conclusion	67
7. SÉPARATION D'ANALGÉSQUES	68
7.1 Introduction	68
7.2 Partie expérimentale	70
7.3 Résultats et discussion	71
7.4 Conclusion	81
8. SÉPARATION CHIRALE DU VALSARTAN	82
8.1 Introduction	82
8.2 Partie expérimentale	85
8.3 Résultats et discussion	85
8.4 Dosage	91
8.5 Conclusion	94
9. SENNOSIDES	95
9.1 Introduction	95
9.2 Partie expérimentale	97
9.3 Résultats et discussion	98
9.4 Stabilité	105
9.5 Dosage	108
9.6 Conclusion	115
10. CONCLUSION ET DÉVELOPPEMENTS FUTURS	116
11. RÉFÉRENCES	117
ANNEXE	xviii

LISTE DES TABLEAUX

III.I	Propriétés physico-chimiques des barbituriques.	21
III.II	Conditions de séparation des barbituriques.	27
III.III	Résultats analytiques pour la séparation des barbituriques.	28
IV.I	Propriétés physico-chimiques des antiviraux.	31
IV.II	Conditions de séparation des antiviraux.	39
IV.III	Résultats analytiques pour la séparation des antiviraux.	40
V.I	Nom, abréviation, groupements fonctionnels et propriétés physico-chimiques des tétracyclinoïdes.	43
V.II	Conditions de séparation des tétracyclinoïdes.	51
V.III	Résultats analytiques pour la séparation des tétracyclinoïdes.	53
VI.I	Propriétés physico-chimiques des pénicillines.	56
VI.II	Conditions de séparation des pénicillines.	65
VI.III	Résultats analytiques pour la séparation des pénicillines.	66
VII.I	Propriétés physico-chimiques des analgésiques.	69
VII.II	Conditions de séparation des analgésiques.	77
VII.III	Résultats analytiques pour la séparation de neuf analgésiques.	79
VII.IV	Résultats analytiques pour la séparation de six analgésiques.	80
VIII.I	Conditions de séparation chirale du valsartan.	90
VIII.II	Résultats analytiques pour la séparation chirale du valsartan.	91
IX.I	Propriétés physico-chimiques des sennosides et des étalons internes.	96
IX.II	Conditions de séparation des sennosides.	104
IX.III	Résultats analytiques pour la séparation des sennosides.	105
IX.IV	Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape A de la mesure de stabilité.	106
IX.V	Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape B de la mesure de stabilité.	107
IX.VI	Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape C de la mesure de stabilité.	108
IX.VII	Dosage des sennosides A et B dans les produits naturels 1 à 6.	109
IX.VIII	Proportions moyennes des sennosides d'intérêt dans les espèces de <i>Cassia</i> et de <i>Rhei Rhizoma</i> mesurées par ÉC et par CLHP.	113
IX.IX	Dosage des sennosides A et B dans le standard USP.	114

LISTE DES FIGURES

1.1	Structure moléculaire, nom et abréviation du SDS.	5
3.1	Structure moléculaire, nom et abréviation des barbituriques étudiés.	20
3.2	Différentes configurations des formes monoénoliques des barbituriques.	21
3.3	Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des barbituriques. Tampon TRIS-HCl (I = 13 mM); voltage 20 kV; injection 1,5 s (50 mbar).	24
3.4	Influence de la force ionique de la solution tampon sur les temps de migration des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.	24
3.5	Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité de séparation des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.	25
3.6	Influence du voltage de séparation sur le temps de migration des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.	26
3.7	Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.	26
3.8	Séparation des barbituriques (c = 0,10 mM) par ÉCZ. Tampon TRIS-HCl (pH 8,2; I = 13 mM); voltage 20 kV; injection 1,5 s (50 mbar).	27
4.1	Structure moléculaire, nom et abréviation des antiviraux étudiés.	31
4.2	Influence du pH de la solution électrolytique sur les temps de migration des analogues antiviraux. Solution électrolytique acide formique/ammoniacale (I = 25 mM), SDS 75 mM; voltage 20 kV; injection 3 s (50 mbar).	35
4.3	Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des pics des analogues antiviraux. pH 10,3; voir figure 4.2 pour les autres conditions expérimentales.	37
4.4	Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des analogues antiviraux. pH 10,3; voir figure 4.2 pour les autres conditions expérimentales.	38
4.5	Séparation des analogues antiviraux (c = 0,25 mM) par ÉCÉM. Solution électrolytique acide formique/ammoniacale (pH 10,0; I = 25 mM), SDS 50 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).	39
5.1	Structure générale des tétracyclinoïdes étudiées.	43
5.2	Structure moléculaire, nom et abréviation du EDTA.	43
5.3	Séparation des tétracyclinoïdes (c = 0,50 mM) par ÉCÉ et ÉCÉM. Tampon acide borique (pH 9,4; I = 63 mM); voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar). Section A : mode ÉCÉ et section B : mode ÉCÉM (SDS 50 mM).	46

5.4	Influence du pH de la solution électrolytique sur les temps de migration des tétracyclinoïdes. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (I = 25 mM), SDS 25 mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).	47
5.5	Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des tétracyclinoïdes. pH 9,5; voir figure 5.4 pour les autres conditions expérimentales.	48
5.6	Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des tétracyclinoïdes. pH 9,5; voir figure 5.4 pour les autres conditions expérimentales.	50
5.7	Séparation des tétracyclinoïdes (c = 0,55 mM) par ÉCÉM. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (pH 9,5; I = 25 mM), SDS 25 mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).	51
5.8	Réaction de décomposition de la tétracycline par épimérisation-déshydratation.	52
5.9	Analyse de la pureté du pic de la Doc (c = 0,55 mM). Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (pH 9,5; I = 25 mM), SDS 25 mM; EDTA 1 mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).	53
6.1	Structure moléculaire, nom et abréviation des pénicillines étudiées.	56
6.2	Structure moléculaire, nom et abréviation du CTAB et du TBAP.	57
6.3	Séparation de la Pivamp (c = 0,125 mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,4; I = 47 mM); voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar). Section A : mode ÉCÉ et section B : mode ÉCÉ (TBAP 60 mM).	61
6.4	Étude des variations des temps de migration par l'injection de solutions de pénicillines (c = 0,13 à 0,30 mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,5; I = 47 mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar). Section A : deux analytes en solution. Section B, C, et D : respectivement trois, quatre et cinq analytes en solution.	62
6.5	Identification des pénicillines (c = 0,17 à 1,24 mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,5; I = 47 mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).	63
6.6	Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des pénicillines. Tampon phosphate, TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).	64
6.7	Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité des pénicillines. pH 6,5; voir figure 6.6 pour les autres conditions expérimentales.	65
6.8	Séparation des pénicillines (c = 0,125 mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,4; I = 47 mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).	66
7.1	Structure moléculaire, nom et abréviation des analgésiques étudiés.	68
7.2	Influence du pH de la solution tampon sur le temps de migration des analgésiques. Tampon phosphate (I = 63 mM), SDS 55 mM; voltage 12 kV; injection 3 s (50 mbar).	73

7.3	Influence de la force ionique de la solution tampon sur le temps de migration des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.	73
7.4	Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.	74
7.5	Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.	75
7.6	Séparation de six analgésiques ($c = 0,23$ mM) par ÉCÉM. Tampon phosphate (pH 6,4; $I = 63$ mM), SDS 55 mM; voltage 25 kV; injection 1,5 s (50 mbar).	76
7.7	Séparation de neuf analgésiques ($c = 0,29$ mM) par ÉCÉM. Tampon phosphate (pH 6,5; $I = 63$ mM), SDS 55 mM; voltage 25 kV; injection 1,5 s (50 mbar).	78
8.1	Structure moléculaire, tridimensionnelle, nom et abréviation de la β -CD.	83
8.2	Structure moléculaire, nom et abréviation du valsartan et de l'urée.	84
8.3	Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration du valsartan. Tampon phosphate, β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 3 s (50 mbar).	87
8.4	Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité du valsartan. pH 7,0; voir figure 8.3 pour les autres conditions expérimentales.	88
8.5	Influence de la concentration en β -CD sur les temps de migration du valsartan. pH 7,0; voir figure 8.3 pour les autres conditions expérimentales.	89
8.6	Structure moléculaire et abréviation de l'hydrochlorothiazide.	89
8.7	Séparation chirale du valsartan ($c = 0,24$ mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; $I = 49$ mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar).	90
8.8	Section A : séparation du valsartan pour une solution standard de 1 % R-valsartan / S-valsartan ($c_R = 0,04$ mM, $c_S = 4,09$ mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; $I = 49$ mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar). Sections B et C : Agrandissements de la section A.	92
8.9	Section A : dosage d'un échantillon commercial de valsartan ($c_S = 3,67$ mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; $I = 49$ mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar). Sections B et C : Agrandissements de la section A.	93
9.1	Structure moléculaire, nom et abréviation des sennosides et des étalons internes étudiés.	96

9.2	Séparation des standards de sennosides ($c = 0,05$ mM) par ÉCZ. Tampon borax (pH 9,5, $I = 50$ mM), ACN 10 %; voltage 25 kV; injection 3 s (50 mbar). * Pics non identifiés.	99
9.3	Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. Tampon carbonate ($I = 80$ mM); voltage 25 kV; injection 3 s (50 mbar).	100
9.4	Graphique A : Influence de la concentration d'ACN sur les temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. pH 9,6 ; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales. Graphique B : Agrandissement d'une section du graphique A.	101
9.5	Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des sennosides. pH 9,6; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales.	102
9.6	Influence du voltage de séparation sur le temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. pH 9,6; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales.	103
9.7	Séparation des standards de sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ. Tampon carbonate (pH 9,6, $I = 80$ mM), ACN 25 %; voltage 25 kV; injection 5 s (50 mbar).	104
9.8	Réaction d'isomérisation du SN A en SN B.	106
9.9	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 1. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	110
9.10	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 2. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	110
9.11	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 3. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	111
9.12	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 4. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	111
9.13	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 5. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	112
9.14	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 6. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	112
9.15	Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le standard USP. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.	115

LISTE DES ÉQUATIONS

1.1	$v_{\dot{e}o} = \mu_{\dot{e}o} E = \frac{L_d}{t_{F\dot{E}O}}$	3
1.2	$v_{\dot{e}p} = v_{app} - v_{\dot{e}o} = \frac{L_d}{t_m} - \frac{L_d}{t_{F\dot{E}O}} = \mu_{\dot{e}p} E$	3
1.3	Longueur du Debye = $\frac{3 \times 10^{-8}}{\sqrt{I}}$	4
1.4	$I = \frac{\sum c_i z_i^2}{2}$	4
1.5	$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = \frac{L_d L_t}{t_m V}$	9
1.6	$s = \frac{\sqrt{\sum (x_i - x_{moy})^2}}{N - 1}$	9
1.7	$CV = \frac{s}{x_{moy}} \times 100$	9
1.8	$N = \frac{\mu_{app} V}{2D}$	10
1.9	$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2$	10
1.10	$R = 2 \left(\frac{t_{m1} - t_{m2}}{w_1 + w_2} \right)$	10
1.11	$A_s = \frac{B}{A}$	10
1.12	$LD = k \left(\frac{DS}{dR/dC} \right)$	11
1.13	$V_{mj} = \frac{\Delta P d^4 t_{mj} \pi}{128 \eta L_t}$	12

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Aire de pic
<i>A</i>	Largeur d'un côté de pic à 10 % de la hauteur par rapport au sommet
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
A_s	Facteur d'asymétrie
Au	Unité d'absorbance
<i>B</i>	Largeur d'un côté de pic à 10 % de la hauteur par rapport au sommet
<i>c</i>	Concentration
CAPS	Acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
CD-ÉCÉ	ÉCÉC avec de la cyclodextrine
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
Com	Comprimé
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (bromure de cetyltriméthylammonium)
CV	Coefficient de variation ou déviation standard relative
ÉCZ	Électrophorèse capillaire de zone
D	Coefficient de diffusion
<i>d</i>	Diamètre interne du capillaire
ddN	2',3'-Didéoxynucléosides
DMSO	<i>Dimethylsulfoxide</i> (sulfoxyde de diméthyle)
dR/dC	Sensibilité de la courbe de calibration
DS	Écart-type du bruit pour le calcul de LD
DTAB	<i>Dodecyltrimethylammonium bromide</i> (Bromure de Dodécyltriméthylammonium)
E	Champ électrique
ÉC	Électrophorèse capillaire
Éch	Échantillon
ÉC/DBP	Électrophorèse capillaire avec un détecteur à barette de photodiodes
ÉDF	Électrolyte de fond (tampon sans additifs, <i>background electrolyte</i>)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (acide éthylènediaminetétraacétique)
ÉI	Étalon interne
ÉCÉ	Électrophorèse capillaire électrocinétique
Ens	Échantillonensemencé
EtOH	Éthanol
Ex.	Exemple
FÉO	Flux électro-osmotique
Fig.	Figure
FMOC	9-fluorénylméthoxycarbonyl
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> (acide γ -aminobutyrique)
Hepta- β -CD	Heptakis(2,6-di- <i>o</i> -methyl)- β -cyclodextrine
I	Force ionique
<i>k</i>	Constante
LD	Limite de détection
L_d	Longueur du capillaire jusqu'au détecteur
LQ	Limite de quantification

L_t	Longueur totale du capillaire
LTM	<i>Sodium N-lauryl-N-methyltaurate</i> (<i>N</i> -lauryl- <i>N</i> -méthyltaurate de sodium)
M1	Matrice de type 1 (pour les SN)
M2	Matrice de type 2 (pour les SN)
ÉCÉM	Électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire
MeOH	Méthanol
MM	Masse molaire
N	Efficacité d'un pic (nombre de plateaux théoriques)
N	Nombre de mesures
$N-1$	Nombre de degrés de liberté
PICRA	Programme intégré Canadien de surveillance de la résistance aux antibiotiques
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
q	Charge
QO/VP	Qualification d'opération et de validation de performance
R	Résolution entre deux pics
s	Écart-type
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (dodécylsulfate de sodium)
sida	Syndrome d'immunodéficience acquise
Soln	Solution
SM	Spectromètre de masse
Std	Standard
T	Température
T_{AMB}	Température ambiante
TBAp	<i>Tetrabutylammonium phosphate</i> (phosphate de tétrabutylammonium)
t_{FEO}	Temps de migration du flux électro-osmotique
THF	Tétrahydrofurane
t_{inj}	Temps d'injection
t_m	Temps de migration de l'analyte
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
u_{epapp}	Mobilité électrophorétique apparente en ÉCÉM
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultraviolet
V	Voltage appliqué
v_{app}	Vitesse apparente
$v_{éo}$	Vitesse électro-osmotique
$v_{ép}$	Vitesse électrophorétique
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
V_{inj}	Volume injecté
w	Largeur à la base du pic
x_i	Valeurs individuelles
x_{moy}	Moyenne
z	Charge
β -CD	β -cyclodextrine
γ -CD	γ -cyclodextrine
ΔP	Différence de pression appliquée
η	Viscosité de l'échantillon
λ	Longueur d'onde d'absorption
μ_{app}	Mobilité apparente

μ_{eo}
 μ_{ep}

Mobilité électro-osmotique
Mobilité électrophorétique

LISTE DES ABRÉVIATIONS DES ANALYTES

3TC	Lamivudine
AAC	Acide anthraquinone-2-carboxylique
AB	Acide benzoïque
Acé	Acétaminophène
Amo	Amobarbital
Amoxy	Amoxycilline
Ampi	Ampicilline
ASA	Acide acétylsalicylique
AZT	Zidovudine
Célé	Célécoxib
Cloxa	Cloxacilline sodium
D4T	Stavudine
ddC	Zalcitabine
ddI	Didanoside
Diflu	Diflunisal
Doc	Doxycycline
HCT	Hydrochlorothiazide
Ibu	Ibuprofène
Kéto	Kétoprofène
L,D-Car	L,D-Carnitine
L,D-Met	L,D-Methorphone HBr
Mnc	Minocycline
Napht	1,3-Dihydroxynaphtalène
Napro	Naproxène
Pento	Pentobarbital
Phéno	Phénobarbital
Pivamp	Pivampicilline HCl
Pn G	Pénicilline G potassium
Pn V	Pénicilline V
PP	Purpurin
S,R-Val	S,R-Valsartan
SA	Acide salicylique
Seco	Secobarbital
SN A	Sennoside A
SN B	Sennoside B
Sul	Sulindac
Tc	Tétracycline

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le CRSNG pour le support financier qui a permis la réalisation de ce projet. Je voudrais aussi dire merci au Dr Karen C. Waldron, ma directrice de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre des études supérieures. Je voudrais particulièrement remercier Jacques Gagnon, le superviseur du laboratoire pharmaceutique de Santé Canada. Ses conseils, son support et son enthousiasme pour ce projet ont été des éléments précieux pour moi. Une mention spéciale à tous les analystes de ce laboratoire pour leurs trucs techniques ingénieux. Je voudrais rappeler la contribution d'Yvan Savoie d' Agilent Technologies pour ma formation initiale sur leur appareil d'électrophorèse capillaire et de l'assistance technique qu'il m'a donnée par la suite. Je voudrais mentionner l'aide de Jean-François Paradis, Richard Bertrand et Kadiatou Sow pour les CLHP, par Ian Levac en informatique, par Anita Décobellis pour l'analyse Karl Fischer et par Ginette Décary pour la recherche de standards. Le service d'analyse des drogues a aussi eu la courtoisie de me faire don d'un microscope. Je voudrais aussi souligner l'importance de l'amitié d'Isabelle Robillard-Frayne, Daniel Gareau, Patrick Eddy Ryan, Émilie Voisin, Geneviève Gouin, Claire Corgniaud, Hélène Gagnon et de Dave Roussel.

Je suis très reconnaissante envers mes parents pour l'affection et le support inconditionnel qu'ils m'ont offerts pendant cette période de ma vie. Votre appui m'a toujours permis d'aller de l'avant dans mes études. Finalement, je voudrais exprimer l'importance de l'apport de mon amoureux, Sylvain Boucher, dans ma vie. Ton amour, ton aide et ton support ont été très significatifs pour moi. Tu as rendu la rédaction de ce mémoire beaucoup plus agréable.

1. INTRODUCTION

1.1 Développement de méthodes par électrophorèse capillaire

De manière générale, l'électrophorèse capillaire (ÉC) permet la séparation, le dosage et l'identification de molécules d'intérêt biologique au niveau de la femtomole. Cette méthode analytique est avantageuse parce qu'elle se base sur des différences de charge, de masse, d'hydrophobicité, d'encombrement stérique et de stéréochimie des molécules selon le mode de séparation choisi¹. Plusieurs avantages sont associés à son utilisation tels qu'une haute efficacité ($N > 10^5$ à 10^6 plateaux théoriques), des temps d'analyse courts, de plus faibles quantités d'échantillon nécessaires pour une grande variété d'applications peu coûteuses (ex. séparation chirale) en plus de travailler en présence d'un milieu aqueux moins coûteux et toxique que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)².

Le présent projet de maîtrise visait deux objectifs. Le premier était de développer des méthodes de séparation de standards pharmaceutiques sur un système d'électrophorèse capillaire avec un détecteur à barette de photodiodes (ÉC/DBP) pour le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada. Ces méthodes ont été développées pour réduire les coûts d'analyse dans le cas de séparations chirales ou afin de développer le potentiel alternatif et complémentaire d'une autre méthode de séparation. Puisque ce laboratoire effectue le contrôle de la qualité des produits pharmaceutiques disponibles, les analyses de ce laboratoire sont essentiellement développées à l'aide de standards pharmaceutiques de haute qualité vendus par l'organisme *United States Pharmacopeia* (USP) pour ensuite être réalisées avec des médicaments afin de contrôler la présence d'impuretés ainsi que de doser les ingrédients actifs. Les méthodes d'ÉC présentées dans ce mémoire ont donc été mises au point dans le but spécifique de séparer individuellement divers médicaments. Pour chacune des séparations effectuées, l'étude des interactions physiques et chimiques entre le tampon, les analytes et le capillaire a été réalisée. Une méthode de séparation pour la quantification d'une impureté contenue dans un médicament chirale a aussi été développée ainsi qu'une étude comparative de la composition de divers produits naturels appartenant à une même catégorie. Le deuxième objectif était de former des analystes du laboratoire à

utiliser l'instrumentation impliquée et de fournir de nouvelles méthodes alternatives de contrôle de la pureté de composés d'application courante.

Le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada pour lequel ces études ont été investiguées a pour mandat d'effectuer le dosage qualitatif et quantitatif des médicaments vendus au pays. Il doit aussi assurer une forme de contrôle sur la qualité des analyses effectuées dans les laboratoires privés.

1.2 Méthodologie

La méthodologie qui a été utilisée afin de réaliser ces diverses analyses fut en premier lieu de sélectionner les familles à séparer puis les analogues de ces familles de composés selon leur niveau de priorité pour Santé Canada. D'après les méthodes présentées dans la littérature, plusieurs avenues possibles ont ensuite été testées et les conditions de séparation des méthodes choisies ont été maximisées d'après certains paramètres analytiques importants. Ce mémoire est donc essentiellement divisé selon les familles d'analytes sous forme de chapitres constitués d'une introduction, d'une partie expérimentale et d'une conclusion qui leurs sont propres. Par ailleurs, ce mémoire inclut une introduction et une partie expérimentale générale et commune ainsi qu'une conclusion globale pour l'ensemble du projet.

1.3 Électrophorèse capillaire de zone

L'électrophorèse capillaire de zone (ÉCZ) est une méthode de séparation basée sur la combinaison de deux phénomènes de transport. La mobilité apparente d'un analyte résulte en effet de la combinaison de la mobilité électro-osmotique et électrophorétique¹. La contribution de la vitesse électro-osmotique à la vitesse apparente est la même pour chaque analyte. Elle provient du flux inhérent au capillaire lorsque celui-ci est rempli d'une solution électrolytique où l'on applique une différence de potentiel entre ses deux extrémités³. À la surface du capillaire, il se crée une double couche électrique (adsorbée et diffuse) qui dicte la direction du flux vers la cathode selon un profil plat³. Cette double couche provient de l'attraction entre les contre-ions en solution et la surface négative de

silanols (-SiOH) lorsque le pH est plus grand que 1,5⁴. La vitesse électro-osmotique est définie par l'équation suivante³ :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \frac{L_d}{t_{FEO}} \quad (1.1)$$

où v_{eo} est la vitesse électro-osmotique en cm s^{-1} , E est le champ électrique en V cm^{-1} , μ_{eo} est la mobilité électro-osmotique en $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, L_d est la longueur du capillaire jusqu'au détecteur en cm et t_{FEO} est le temps de migration du flux électro-osmotique (FEO). Les analytes n'ayant pas de charge propre ($q = 0$) n'auront pas de vitesse électrophorétique et migreront à la vitesse du flux électro-osmotique⁵. L'apport de la vitesse électrophorétique à la vitesse apparente d'un analyte varie selon la charge de l'analyte. En effet, un cation aura une contribution positive puisque qu'il se dirige naturellement vers la cathode et un anion, négative. Malgré l'attraction des anions vers l'anode, la grandeur du flux électro-osmotique est généralement suffisante, lorsque le pH est plus grand ou égal à 5, pour obtenir un déplacement vers la cathode et, ce, même pour des anions portant trois charges^{1,6}. La contribution de cette mobilité est cruciale parce qu'elle permet la séparation de cations et d'anions ainsi que la séparation de molécules de taille plus importante ou faiblement chargées dans une même analyse en un temps raisonnable⁶. À l'aide de la vitesse électro-osmotique du marqueur de flux et de la vitesse apparente des divers analytes, leur vitesse électrophorétique peut être déterminée⁵ :

$$v_{ep} = v_{app} - v_{eo} = \frac{L_d}{t_m} - \frac{L_d}{t_{FEO}} = \mu_{ep} E \quad (1.2)$$

où v_{ep} est la vitesse électrophorétique en cm s^{-1} , v_{app} est la vitesse apparente en cm s^{-1} , μ_{ep} est la mobilité électrophorétique en $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ et t_m est le temps de migration de l'analyte. La charge de l'analyte sera estimée par la valeur de v_{ep} . En effet, un anion aura une vitesse négative (dans le sens contraire du FEO) et un cation, une vitesse positive⁵. Il est important de mentionner qu'en électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (ÉCÉM), la valeur obtenue pour le calcul de la mobilité électrophorétique est apparente (u_{epapp}) puisqu'elle est constituée du mélange de la mobilité de l'analyte libre en solution (ÉCZ) et de celle en micelle selon la constante de partage entre l'analyte et la micelle⁷.

1.4 Techniques électrophorétiques

Pour accommoder un plus grand éventail de composés, plusieurs modes de séparation existent en plus de l'électrophorèse capillaire de zone puisque les analytes neutres n'y seront pas séparés. Certains de ces modes ont été couramment utilisés dans ce contexte en fonction de la structure des drogues à analyser. Tel que décrit précédemment en ÉCZ, la séparation des analytes est effectuée selon leur charge nette respective (q) ainsi que leur taille (rayon hydraté) selon les principes de l'équation de Hückel. Par contre, pour obtenir un FÉO reproductible, cela nécessite que le pH, la force ionique (voir équation 1.3 et 1.4) et la composition du tampon soient contrôlés ($v_{ep} \propto \mu_{ep} \propto q/r \propto q/MM$)^{1,5,8}.

$$\text{Longueur du Debye} = \frac{3 \times 10^{-8}}{\sqrt{I}} \quad (1.3)$$

$$I = \frac{\sum c_i z_i^2}{2} \quad (1.4)$$

où longueur du Debye est l'épaisseur de la double couche ionique en cm, I est la force ionique en M, c_i est la concentration de l'ion en M et z_i sa charge.

Lorsque l'on désire obtenir une séparation plus spécialisée, d'autres modes sont préférés tel que le mode d'électrophorèse capillaire électrocinétique (ÉCÉ)⁷. Le mode d'ÉCÉ utilisant des micelles a été inventé par Terabe en 1984 et comprend aujourd'hui l'ajout d'additifs tels que des surfactants, des composés chiraux, des polymères, etc^{7,9}.

Pour ce projet, un mode favorisé a été celui d'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (ÉCÉM). Il consiste à ajouter un surfactant (agent tensioactif) dans le tampon afin de permettre la séparation d'analytes neutres. Lorsque le surfactant est présent en quantité supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC), il se crée des micelles qui agissent comme une phase pseudo-stationnaire^{1,9}. Un mécanisme de partage très rapide est donc rajouté aux mécanismes de transport déjà existants en solution libre¹. Par exemple, si ce surfactant est anionique tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS; le plus couramment

employé; figure 1.1), la surface des micelles en milieu aqueux sera anionique et l'intérieur sera hydrophobe³. Les molécules neutres pourront donc s'associer à l'intérieur des micelles par des interactions de Van der Waals selon leur structure et taille. Ce transfert entre la phase aqueuse et l'intérieur de la micelle sera très rapide avec le SDS. Par exemple, le benzène ne restera à l'intérieur que pour une période de seulement 10^{-4} s⁹. Plus la molécule est hydrophobe, plus elle passera de temps dans la micelle et plus elle sera alors ralentie par rapport à sa migration en solution libre¹. Sa nouvelle migration est alors fonction du coefficient de distribution, de la migration de la solution et de celle des micelles¹⁰. Les cations seront fortement attirés par la surface négative des micelles par des interactions électrostatiques ou encore à des molécules de surfactant libres en solution. À l'inverse, les anions devraient être peu affectés par la présence des micelles s'ils sont peu hydrophobes¹. L'ordre d'élution observé sur l'électrophérogramme par rapport au mode ÉCZ sera donc changé. On peut supposer que l'ordre général pour un surfactant anionique serait le suivant : les petites molécules polaires, les anions, les molécules neutres selon leur hydrophobicité, les cations et les micelles. En mode ÉCÉM, le pH doit être supérieur ou égal à six pour que le FÉO soit suffisamment fort pour emporter les micelles anioniques jusqu'au détecteur⁷. Il est important de mentionner que l'ordre d'élution de ce mode n'est pas aussi prévisible qu'en ÉCZ puisque deux mécanismes de séparation sont observés.

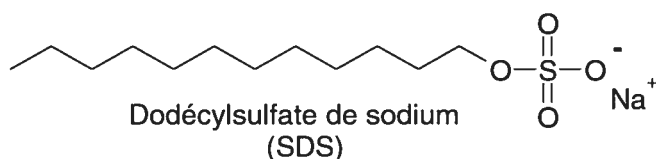


Figure 1.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation du SDS.

Pour ce projet, seul le SDS a été utilisé comme surfactant dans un intervalle de concentrations suggéré par la littérature, soit entre 10 et 100 mM⁸. Au-delà de la limite supérieure de cet intervalle, des problèmes d'élargissement des pics et de courant par l'effet Joule seraient visibles¹¹. La limite inférieure est, quant à elle, dictée par la concentration micellaire critique dans l'eau et le tampon phosphate de 8 et de 4 mM respectivement¹². Par contre, des surfactants cationiques, neutres, chiraux ou zwitterioniques peuvent aussi être utilisés³. Un des points intéressants à noter avec un surfactant cationique est que plusieurs types de micelles peuvent exister. En effet, selon la quantité ajoutée, le type de

recouvrement dynamique des parois du capillaire peut varier de manière à obtenir des hémimicelles ou des admicelles, ce qui peut entraîner une inversion de la polarité par celle du FEO⁴.

Les molécules d'intérêt biologique telles que les produits pharmaceutiques présentent souvent des mécanismes de reconnaissance chirale¹³. Il est donc intéressant de développer des méthodes de séparation à cet effet. En général, pour la séparation de diastéréoisomères ayant des propriétés physiques suffisamment différentes, des mobilités distinctes peuvent être trouvées en solution libre¹⁴. Dans le cas de diastéréoisomères trop semblables ou d'énantiomères, l'utilisation d'un mode de transport chiral en électrophorèse capillaire électrocinétique (ÉCÉ) est avantageuse¹⁴. Ceci est réalisé en utilisant des additifs de nature chirale tels que les cyclodextrines, les couronnes d'éther ou les sels biliaires tels que le déoxycholate de sodium. L'ajout de tels additifs au milieu peut permettre de stabiliser davantage l'inclusion d'un des isomères dans la cavité hydrophobe. Cela crée alors une différence dans les temps de migration apparents^{1,14}.

D'autres modes de séparation existent tels que l'électrochromatographie capillaire, l'électrophorèse capillaire sur gel, l'électrophorèse à focalisation isoélectrique et l'électrophorèse capillaire en milieu non-aqueux^{1,2,3,5,15}. L'électrochromatographie capillaire est la combinaison théorique de l'ÉC et la CLHP. En effet, une phase stationnaire est ajoutée et la migration du solvant est effectuée par électro-osmose sans pression additionnelle³. Ce mode permet, tout comme l'ÉCÉM, de séparer des molécules non-chargées¹⁵. L'électrophorèse capillaire sur gel de polymère permet la séparation de molécules de grandes tailles. Les macromolécules y sont isolées par un mécanisme d'exclusion de la taille et de la charge^{1,2,3,5}. L'électrophorèse à focalisation isoélectrique sépare les analytes selon leur point isoélectrique. Un gradient de pH linéaire est utilisé pour les faire migrer à l'aide d'une pression hydraulique à travers le détecteur^{1,2,5}. Quant à elle, la séparation en milieu non-aqueux se fait en présence d'un électrolyte pour augmenter le FEO. Elle permet d'effectuer la séparation de molécules qui seraient insolubles en milieu aqueux ou qui y auraient des mobilités identiques¹⁶.

1.5 Détection en électrophorèse capillaire

Plusieurs détecteurs peuvent être utilisés en électrophorèse capillaire. En effet, il est possible de coupler cette instrumentation avec un détecteur de fluorescence, d'ampérométrie, d'indice de réfraction, d'absorbance UV/visible ou de spectrométrie de masse^{5,6}. La détection en électrophorèse capillaire peut être un facteur restrictif à la performance de l'appareil par rapport à celle de la CLHP⁸. En électrophorèse capillaire, un diamètre de capillaire réduit permet une meilleure dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Dans le cas contraire, la mobilité électrophorétique peut augmenter selon un taux de 2 %/°C^{1,6}. Par contre, diminuer ce diamètre aura un effet négatif sur le volume total du système (autour du μm) et sur la longueur du parcours optique et, donc, sur la sensibilité à la concentration des analytes¹⁷. De plus, vue la forme circulaire du capillaire, le parcours optique n'est à son maximum que lorsque le faisceau lumineux passe au centre exact du capillaire^{2,6}. Le détecteur doit donc être suffisamment rapide et sensible pour obtenir de bonnes limites de détection (LD).

La détection par absorption UV/visible est la méthode de détection la plus utilisée en EC à cause de son universalité². Malgré la petite longueur du parcours optique, cette méthode a l'avantage d'être effectuée à même le capillaire. Puisqu'il n'y a pas de volume mort, on observe peu d'élargissement de zone². De plus, une grande résolution est obtenue par rapport à la largeur des pics puisque la zone de détection est petite². Dans le cas présent, la détection a été effectuée à l'aide d'un détecteur à barrette de photodiodes. Celui-ci permet d'étudier plusieurs longueurs d'onde simultanément. Il présente un grand nombre (211 par exemple) de photodiodes de silicium côte à côte sur une barrette^{2,18}. Ces photodiodes agissent comme des semi-conducteurs parce que le rayonnement lumineux y est proportionnel à la différence de conductivité¹⁸. L'émission utilisée pour la détection est effectuée par une lampe au deutérium qui présente l'avantage d'émettre un spectre continu en ultraviolet jusqu'à 400 nm avec un maximum d'intensité situé vers 200 nm^{18,19}. Un réseau de diffraction permet de disperser l'émission de la lampe sur la barrette de photodiode pour l'envoyer ensuite sur l'échantillon contenu dans le capillaire. Par son spectre continu, ce système donne accès à la détection d'un grand nombre de composés.

Par contre, la LD en absorbance est généralement autour de l'ordre du micromolaire (10^{-5} à 10^{-6} M)².

Plusieurs techniques permettent d'augmenter la performance des détecteurs d'absorbance UV/visible. L'utilisation d'un capillaire de forme alternative peut augmenter la longueur du parcours optique. Tsuda et coll. ont effectué une étude sur l'utilisation de capillaires rectangulaires²⁰. Cela leur a permis d'augmenter la sensibilité d'un facteur de 15 pour la détection par absorbance UV/visible²⁰. Une méthode plus accessible consiste à utiliser un capillaire à *bubble cell* d'Agilent Technologies². Ce type de capillaire est disponible commercialement et consiste en un capillaire de forme standard auquel une zone de détection élargie de forme bombée a été ajoutée. Cette structure particulière permet à la fois d'augmenter la sensibilité d'un facteur de trois et de limiter l'impact sur la séparation puisqu'une seule zone est élargie².

Parmi les autres détecteurs existants, certains sont plus adaptés et performants pour l'EC. En effet, utiliser un détecteur de fluorescence par induction LASER permet d'obtenir une bonne sélectivité et une excellente sensibilité. En effet, une LD de l'ordre de $4,1 \times 10^{-11}$ M a pu être atteint en 1994 à l'aide de ce type de détecteur¹⁷. Par contre, peu de molécules sont naturellement fluorescentes. La dérivation pré- ou post-capillaire devient alors nécessaire ou, encore, la détection doit être effectuée indirectement ce qui diminue sa performance²¹. Le couplage avec un spectromètre de masse (SM) est un autre mode avantageux pour sa sensibilité mais aussi parce qu'il permet l'analyse structurale des analytes. Par contre, vu les différences de conditions d'utilisation, des ajustements importants doivent être apportés en conséquence afin de rendre ce couplage possible. En effet, la séparation se fait en phase liquide en présence de tampon, de haut voltage et de débit de l'ordre de 0,1 cm/s tandis que le détecteur fonctionne en transférant les ions gazeux sous vide²².

1.6 Paramètres analytiques

Plusieurs paramètres analytiques définissent la qualité d'une méthode d'analyse. Ces paramètres sont importants puisqu'ils démontrent la validité de la méthode. Par exemple,

ils servent à qualifier l'efficacité, la précision, l'exactitude et la reproductibilité d'une méthode. Les premiers paramètres analytiques observés sont la reproductibilité du temps de migration, de l'aire du pic et de la mobilité apparente. Pour le temps de migration et la mobilité apparente, leur grandeur est aussi considérée comme le témoin de la rapidité de la séparation. La mobilité apparente est définie par l'équation suivante² :

$$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = \frac{L_d L_t}{t_m V} \quad (1.5)$$

où μ_{app} est la mobilité apparente en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, V est le voltage appliqué en V et L_t est la longueur totale du capillaire en cm . La reproductibilité est mesurée par le calcul de l'écart-type sur la mesure (s) et du coefficient de variation (CV) selon les équations 1.6 et 1.7¹⁸.

$$s = \frac{\sqrt{\sum (x_i - x_{moy})^2}}{N - 1} \quad (1.6)$$

$$CV = \frac{s}{x_{moy}} \times 100 \quad (1.7)$$

où x_{moy} est la moyenne des valeurs trouvées, x_i sont les valeurs individuelles et $N-1$ le nombre de degrés de liberté. En théorie, la reproductibilité de la migration est fonction de l'âge du capillaire et de son histoire. Cela signifie qu'elle est reliée aux conditions préalablement utilisées telles que la force ionique du tampon, le préconditionnement, le voltage, l'injection, la température de l'environnement du capillaire et l'interaction des analytes avec les parois du capillaire^{8,23}. Selon Agilent Technologies, la reproductibilité des paramètres analytiques devrait se situer entre 0,3 et 1 % pour le temps de migration et la mobilité apparente et entre 1 et 3 % pour l'aire du pic²⁴.

L'efficacité de la séparation ainsi que sa résolution sont des facteurs importants à considérer pour la qualité d'une séparation. De manière générale, l'efficacité en ÉCZ est très grande ($N > 100\,000$ plateaux théoriques) à cause de l'absence de parcours multiples dans le capillaire exempt de particules³. De plus, il n'y a pas de transfert de masse parce qu'il n'y a aucune phase stationnaire. L'équation de Van Deemter ne comporte donc qu'un

seul terme, soit celui de la diffusion longitudinale³. Selon Jorgenson⁶, seule la diffusion moléculaire est responsable pour la diffusion longitudinale. En utilisant l'équation d'Einstein de la variance et l'équation de Giddings, Jorgenson démontre que l'efficacité serait indépendante de la longueur du capillaire et du temps d'analyse. Elle serait plutôt reliée à la mobilité, au coefficient de diffusion et au voltage appliqué⁶. Selon l'équation 1.8, une augmentation du voltage augmenterait alors l'efficacité (N)⁶.

$$N = \frac{\mu_{app} V}{2D} \quad (1.8)$$

où D est le coefficient de diffusion (cm^2/s). La résolution est aussi une mesure à déterminer puisqu'elle informe sur la capacité de la méthode à séparer les divers analytes. Elle devrait être d'au moins 1,5 afin d'obtenir une séparation optimale entre deux pics, ce qui correspond physiquement à un retour à la ligne de base ou un chevauchement maximum de 0,3 %¹⁸. Les équations 1.9 et 1.10 ont été utilisées pour le calcul de l'efficacité et de la résolution¹⁸:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (1.9)$$

$$R = 2 \left(\frac{t_{m1} - t_{m2}}{w_1 + w_2} \right) \quad (1.10)$$

où R est la résolution entre deux pics, w est la largeur d'un pic à sa base en minutes et N est l'efficacité du pic. Pour certains des analytes qui ont été étudiés lors de ce projet, le facteur d'asymétrie du pic a aussi été calculé selon l'équation 1.11^{3,25}. Ceci a aussi permis dans certains cas, de noter la qualité de la séparation en terme de la distribution de population dans le pic.

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (1.11)$$

où A_s est le facteur d'asymétrie, A et B sont les largeurs en cm de chaque côté du sommet du pic à 10 % de sa hauteur.

La LD, la sensibilité et le domaine de linéarité sont aussi des paramètres analytiques importants à définir. En effet, un grand nombre de méthodes de calcul existent et elles offrent des précisions et exactitudes différentes. La méthode qui a été privilégiée est l'une des méthodes investiguées par Hayashi et coll.²⁶. Cette méthode de calcul a été privilégiée parce qu'elle est en accord avec les directives de la direction des médicaments¹¹² de Santé Canada données ultérieurement. De plus, parmi les méthodes de Hayashi et coll., celle-ci semblait plus simple à appliquer pour une précision acceptable. La définition de la méthode privilégiée est la suivante :

$$LD = k \left(\frac{DS}{dR/dC} \right) \quad (1.12)$$

où LD est la limite de détection en M (mol/L), k est une constante, DS est l'écart-type du signal de fond (bruit) en mAu et dR/dC est la sensibilité de la courbe d'étalonnage en mAuM^{-1} . Il est important de noter que le terme dR du dénominateur de l'équation 1.12 représente spécifiquement la hauteur du pic. En effet, l'écart-type DS sur le signal de fond de trois électrophérogrammes de blancs a été déterminé par rapport à sa hauteur et non son aire. Le signal doit donc aussi être rapporté en terme de hauteur et non d'aire pour la détermination du domaine de linéarité et de la sensibilité. Ce choix alternatif entraîne toutefois une diminution de la sensibilité et de la précision². En effet, la sensibilité d'une courbe de calibration effectuée selon la hauteur aurait tendance à diminuer à de plus grandes concentrations²⁷. Quant à elle, une courbe de calibration en fonction de la hauteur était plus avantageuse à utiliser entre autre parce que la reproductibilité y serait meilleure à de basses concentrations²⁷.

Il est aussi important de noter que si k est égal à 3, cela entraîne une probabilité de seulement 0,1 % que la LD provienne de la fluctuation de la ligne de base²⁶. De cette définition, Hayashi et coll. ont développés trois de leurs cinq méthodes de calcul de la LD dont certaines se sont avérées plus complexes ou moins exactes. La limite de quantification

(LQ) a aussi été calculée à partir de l'équation 1.12 avec k égal à 10^{28} . Ces méthodes ont été développées pour l'analyse d'ingrédients actifs de formules pharmaceutiques qui ne sont normalement pas présents à l'état de trace.

Finalement, le volume d'injection doit être calculé puisqu'il doit idéalement correspondre à 1 ou 2 % du volume total du capillaire^{2,29}. Ceci a pour avantage de limiter la quantité nécessaire pour effectuer l'analyse et de permettre d'obtenir une meilleure résolution puisque la contribution apportée à l'élargissement des pics est faible². Deux modes d'injection existent en EC. Le premier est l'injection électrocinétique et consiste à injecter quelques nanolitres en appliquant un champ électrique. Ce mode est désavantageux parce que les analytes sont injectés selon leur mobilité apparente et, donc, la quantité injectée pour chaque analyte sera variable. Ce mode est préférentiellement utilisé lors d'analyses qui nécessitent une sensibilité particulière^{3,8}. Le deuxième mode est l'injection hydrodynamique qui a été utilisée dans le cadre de ce projet. L'injection se produit alors par application d'une pression positive ou négative par rapport à la solution de l'échantillon³. Ce volume peut être déterminé théoriquement à partir de l'équation de Hagen-Poiseuille^{2,3} :

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 t_{inj} \pi}{128 \eta L_c} \quad (1.13)$$

où V_{inj} est le volume injecté en nL, ΔP est la différence de pression appliquée entre les deux extrémités du capillaire en $\text{kgm}^{-1}\text{s}^{-2}$, d est le diamètre interne du capillaire en m, t_{inj} est le temps d'injection où ΔP est appliqué en s et η est la viscosité de l'échantillon que l'on assume être approximativement celle de l'eau ($0,001 \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ce mode est avantageux parce qu'il permet d'obtenir une meilleure reproductibilité.

Les paramètres présentés précédemment ont donc été déterminés pour chacune des méthodes de séparation. Les chiffres significatifs de ces divers résultats sont donnés selon les différents écart-types. Pour les graphiques, seules les barres d'erreurs pour l'efficacité seront données puisque leur représentation aurait été peu utile dans le cas des temps de migration vu leur petite représentation dans les graphiques respectifs. En effet, pour les barbituriques, les antiviraux, les tétracyclinoïdes, les analgésiques, le valsartan et les

sennosides, l'erreur sur les temps de migration est inférieure à 1,1 %. Ces barres d'erreurs seraient donc très difficilement visibles sur les graphiques de maximisation. Par contre, cela n'est pas le cas pour les pénicillines puisque les erreurs sur les temps de migration étaient jusqu'à sept fois plus grandes que 1,1 %. Ces barres seront donc présentées. Pour tous les graphiques de maximisation, le nombre de mesures a été déterminé à deux et, donc, chaque point représente une valeur moyenne. Quoique ce nombre soit faible selon les valeurs généralement préférables, celui-ci a été choisi en fonction du temps requis pour maximiser chacun des paramètres sélectionnés. Pour la méthode finale choisie, le nombre de mesures est plus grand, soit de 3 et de 4 pour les sennosides. Les résultats relatifs au domaine de linéarité et à la LQ ont été effectués à partir de la courbe de sensibilité où chacune des cinq mesures était effectuée en duplicata sur une échelle de concentration de dix. Ce mémoire présente donc de nombreuses méthodes de séparation chirale ou non selon les différentes classes de médicaments.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1 Instrumentation et réactifs

Le type d'instrument qui a été utilisé pour effectuer l'analyse de toutes les catégories de composés est un appareil d'électrophorèse capillaire de la compagnie Agilent Technologies (3D-CE Chemstation) qui est équipé d'un détecteur à barette de diodes. La maintenance de l'appareil a été effectuée une fois par semaine de manière à minimiser les dépôts accumulés sur les électrodes. De plus, un test d'opération et de maintenance prescrit par Agilent a été effectué à chaque changement de pièces dans l'appareil, c'est-à-dire approximativement une fois par année. Avant chaque séquence d'analyses, un ajustement entre l'alignement du capillaire et le détecteur a systématiquement été effectué afin d'optimiser les conditions de détection. Finalement, les tampons utilisés pour toutes les méthodes ont été préparés à partir de tables de tampons établies et les réactifs étaient minimalement de qualité analytique³⁰⁻³². Ces tables ont été préférablement utilisées parce qu'elles permettaient de mieux contrôler à la fois la force ionique et le pH du tampon. En effet, il semblait ainsi plus facile de pouvoir faire varier un des deux paramètres tout en gardant l'autre constant.

Les standards pharmaceutiques qui ont été utilisés lors des analyses provenaient majoritairement de chez *United States Pharmacopeia* (USP; Montréal, Canada) et étaient d'une pureté d'entre 85,0 et 99,9 %. En effet, l'acide acétylsalicylique, l'amoxicilline, l'ampicilline, l'acétaminophène, la cloxacilline, le diflunisal, l'ibuprofène, le naproxène, la penicilline G, le sulindac, l'acide salicylique, le mélange de sennosides A et B, les quatres barbituriques et les trois tétracyclinoïdes provenaient de chez USP. Parmi ces standards, il est important de mentionner que la pureté du mélange des sennosides était de 96,2 % et celle des standards isolés du sennoside B et A achetés chez Fluka (Oakville, Canada) étaient de 97,3 % et de plus de 98 % respectivement. Les standards de l'acide anthraquinone-2-carboxylique, l'acide acétylsalicylique et la zalcitabine ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Canada) avec une pureté de 98,0 à 99,8 %. Les qualités relatives des standards d'USP et de Aldrich pour l'acide acétylsalicylique ont été comparées entre elles. Le célécoxib provient de chez Searle, le kétoprofène de chez British pharmacopea (Stanmore, United Kingdom), la pivampicilline à 95,5 % de Leo

Pharmaceutical Products (Thornhill, Canada), le lamivudine à 99,8 % et la zidovudine à 99,4 % de Glaxo Wellcome (Kirkland, Canada), la penicilline V de Wyett Ayerst (St-Laurent, Canada) et le didanoside à 99,5 % et le stavudine à 98,8 % de Bristol Myers Squibb (St-Laurent, Canada). Le S-valsartan et son impureté chirale, le R-valsartan, proviennent de chez Novartis (Dorval, Canada) et leurs puretés respectives est de 99,2 et 97,2 %. Les réactifs qui ont servi pour les diverses séparations, tels que l'ammoniaque et le SDS, étaient tous de qualité analytique sauf quelques exceptions jugées de pureté suffisante. En effet, la qualité de l'acide formique était de 95 à 97 % et celle du phosphate de tétrabutylammonium était de 97 %. La pureté des agents chiraux n'était pas disponible.

2.2 Manipulations communes

Lors de l'analyse des diverses familles de drogues, plusieurs manipulations ont été effectuées de manière similaire. Par exemple, la méthode utilisée était toujours construite à partir des propriétés physico-chimiques des molécules et d'un survol de la littérature disponible. Si certains analytes semblaient à prime abord correspondre davantage à une séparation de composés neutres par ÉCÉM, un test en mode ÉCZ était aussi effectué afin de possiblement simplifier la méthode de séparation. Cela permettait aussi de déterminer les charges apparentes des molécules par rapport au FÉO dans des conditions similaires. Lorsque la méthode était satisfaisante, une maximisation des paramètres était effectuée afin de finaliser la méthode au niveau de l'efficacité, la reproductibilité, la sensibilité, la sélectivité et le temps d'analyse. Il est important de mentionner que de maximiser individuellement les paramètres n'entraîne pas nécessairement l'optimisation de la méthode³³. L'utilisation de méthodes statistiques telle que la méthode des simplex est théoriquement plus efficace mais est aussi beaucoup plus complexe à utiliser³³. En effet, la réussite de l'optimisation par la fonction de réponse dépend du choix des facteurs à étudier ainsi que de leur nombre, surtout lorsque ce nombre est supérieur à deux³³. Il est donc probable que des méthodes alternatives existent. Dans ce projet, la maximisation individuelle des paramètres analytiques a été réalisée en étudiant un intervalle donné constitué de cinq valeurs dupliquées. Par l'analyse du graphique résultant, l'effet sur le temps de migration ou l'efficacité des analytes étaient étudiés. Par exemple, l'injection a été effectuée hydrodynamiquement selon les principes présentés dans le chapitre 1 et elle a

été maximisée sur un intervalle de 4 s afin d'obtenir une efficacité maximale possible tout en respectant la sensibilité de la méthode.

À moins d'indications contraires, la température des analyses était celle de la température ambiante. Toutes les solutions ont été mises dans des vials en polypropylène conçus à cette fin³⁴. Ils ont tous été rincés avant leur utilisation et remplis précisément de moitié de manière à avoir des vials contenant approximativement des volumes équivalents à l'entrée et la sortie du capillaire³⁴. Cette prédisposition permettait de diminuer l'influence du nivellement sur la reproductibilité⁸. Les bulles initialement visibles dans les solutions ont été éliminées à l'aide d'un sonicateur et les autres ont ensuite été retirées manuellement puisqu'elles auraient pu causer des fluctuations du signal de fond ou du courant³⁴.

Vu le coût des capillaires préfabriqués de la compagnie Agilent (122 \$/capillaire), des capillaires maison ont été utilisés pour réaliser les diverses séparations puisque leur coût était réduit à 4 \$ par 50 cm. Ces capillaires ont été fabriqués à partir d'une bobine de colonne capillaire provenant de chez Polymicro Technologies (Phoenix, USA). Ce capillaire avait un diamètre interne de $(50 \pm 3) \mu\text{m}$ et un diamètre externe de $(363 \pm 10) \mu\text{m}$. La méthode de préparation des capillaires a été standardisée. En effet, à moins d'indications contraires, ils avaient généralement une longueur totale et effective standard de 48,5 cm et de 40 cm respectivement. La distance entre la sortie du capillaire et la fenêtre de détection devait être de 8,5 cm pour toutes les longueurs totales de capillaire. En effet, c'est la longueur optimale prescrite par rapport à la forme de la cassette utilisée comme support du capillaire dans l'instrument. La fenêtre de détection a été faite à l'aide du *Window maker* de MicroSolv Technology Corporation (Long Branch, ÉU) afin d'améliorer et de standardiser la zone de détection d'un capillaire à l'autre. Ce système permet d'obtenir la chaleur nécessaire pour brûler une section de 2 mm du polymère protecteur sans déformer ou affaiblir le verre. Ces capillaires ont été coupés et polis à la main à chaque extrémité à l'aide d'un coupe-colonnes capillaires en céramique. Le polissage était effectué à 90° de manière à avoir une surface parfaitement plane et à 45° afin d'effectuer un retrait du polymère protecteur en polyimide par rapport à la silice. Il était important qu'un minimum de débris du polissage se retrouve dans le capillaire afin de ne pas l'obstruer ou interférer avec le FÉO. Par contre, la présence d'imperfections dans la coupe pouvait causer l'entrée de bulles d'air ou créer des variations dans le courant ou dans le signal de

fond lors des analyses³⁵. L'inspection des capillaires au microscope permettait d'éliminer les imperfections visibles dans la coupe.

Finalement, les capillaires ont été systématiquement remplacés lors des changements de familles de composés à analyser ou de modifications significatives dans la méthode. En effet, lorsque le pH de la méthode varie dramatiquement (aller-retour de pH 2 à 12) ou qu'il se situe entre 4 et 6 (près du pK_a de la silice), cela a une influence importante sur le FÉO³⁶. De la même manière, l'ajout d'additifs dans le tampon aura une influence sur les parois du capillaire à long terme et, donc, sur le FÉO^{2,36}. Un phénomène similaire sera observé lorsque le nombre d'analyses successives est trop élevé et que le préconditionnement du capillaire n'est pas suffisamment efficace³⁶. En effet, selon un article rédigé par Smith et coll., le capillaire subirait des modifications internes lors du passage des solutions d'analyse^{23,37}. Il devrait donc être conditionné un nombre minimum de fois avant d'atteindre un état plus stable où une bonne reproductibilité est obtenue^{23,37}. Le préconditionnement entre chacune des analyses est alors essentiel pour conserver cette stabilité^{23,37}. Expérimentalement, il a été convenu que chaque série de solution serait utilisée selon la stabilité du tampon, soit entre 4 et 6 analyses avant d'être changée. Ce changement était effectué puisque le phénomène connu des réactions d'électrolyse de l'eau à chaque électrode lors de l'application prolongée d'un haut voltage cause un changement dans le pH de chaque réservoir de tampon utilisé lors des séparations³⁸. Un changement fréquent de tampon aide donc à diminuer les variations dans la force ionique et dans les volumes contenus dans les vials. Une méthode standard de conditionnement pour chaque analyse a été développée pour les analyses en ÉCZ et en ÉCÉ. Initialement, il a été constaté que l'exposition prolongée (20 minutes) de la silice à des tampons de pH trop élevés résultait en la dégradation prématurée du capillaire par dissolution du verre en plus de rallonger inutilement l'analyse. La méthode de préconditionnement sélectionnée en ÉCZ consiste donc en un premier rinçage plus court à l'hydroxyde de sodium 0,1 N. Ce lavage avait pour objectif d'augmenter la reproductibilité des temps de migration en rétablissant les charges sur les parois du capillaire^{8,36}. Par contre, ce rinçage n'était pas effectué en ÉCÉ parce qu'il a été constaté que cela semblait avoir une influence néfaste sur les micelles présentes lors de la séparation des tétracyclinoïdes. Le groupe de Lloyd³⁹ observait effectivement une baisse de reproductibilité lorsqu'un lavage à l'hydroxyde de sodium était utilisé pour ce mode. Elle serait due à des différences de pH qui affecteraient

la surface et, donc, le FÉO. L'étape suivante du préconditionnement en mode ÉCZ était une mise en attente dans le milieu alcalin. Le but étant de déprotonner un maximum de silanols tel que suggéré par Agilent³⁵ comme méthode de préconditionnement. Le capillaire était ensuite rincé à l'eau afin d'éliminer l'hydroxyde de sodium qui aurait pu affecter le pH du tampon pendant la séparation. Finalement, le dernier rinçage était fait à l'aide du tampon d'analyse. Cette dernière étape avait évidemment comme objectif de laver mécaniquement le capillaire afin de le préparer à l'analyse elle-même²³. En ÉCÉ, la méthode testée étant la plus efficace était la suivante : deux rinçages successifs avec le tampon d'analyse entrecoupés d'un temps d'attente afin de déprotonner un maximum de silanols dans les conditions de pH utilisées. Pour tous les modes de séparation appliqués, un conditionnement spécial du capillaire inspiré de la littérature⁴⁰ était effectué en début et en fin de séquence ainsi qu'à toutes les deux séries de 4 à 6 analyses. Le préconditionnement initial ou entre deux séries était similaire à celui effectué en mode ÉCZ quoique plus intensif. En effet, il était constitué d'un rinçage à l'hydroxyde de sodium de cinq minutes suivi d'un temps d'attente de trois minutes et d'un rinçage à l'eau de cinq minutes. Le conditionnement final d'une séquence (en fin de journée par exemple) était constitué de trois rinçages de trois minutes à l'hydroxyde de sodium, à l'eau puis à l'air pour son entreposage³.

Un autre facteur commun à toutes les méthodes de séparation est la méthode de mise en solution des analytes. D'une manière générale, la mise en solution était effectuée à l'aide d'un minimum de solvant organique pour ensuite être complétée avec le tampon d'analyse ou de l'eau de qualité zénopure (niveau de filtration). La présence de solvant organique avait deux fonctions : aider à la mise en solution et marquer le FÉO. Le marqueur permet effectivement de calculer la mobilité électro-osmotique du FÉO ainsi que la mobilité électrophorétique et la charge apparente des analytes. Généralement, ce marqueur est le MeOH, l'ACN ou le DMSO. De plus, ces marqueurs neutres, polaires et de basses masses moléculaires n'interagissent que peu ou pas avec les micelles de SDS en ÉCÉM. Ils sont donc toujours relativement valides dans le cas d'un changement de mode de séparation¹⁰. Un marqueur de micelles tel que le dodécaphénone aurait pu aussi être systématiquement utilisé pour les séparations en ÉCÉM. En effet, étant totalement dissous à l'intérieur des micelles, il permet de déterminer la fin de la fenêtre de migration¹⁰ mais les quelques tests effectués à cet effet n'ont pas été concluants. D'une manière générale, la matrice qui était

utilisée pour dissoudre les analytes était telle que sa conductivité était inférieure à celle du tampon d'analyse. Cela permettrait de créer un effet de *stacking* pendant l'analyse afin d'augmenter la hauteur des pics et, donc, leur efficacité et leur résolution⁸. Le *stacking* résulte de la différence de conductivité entre l'échantillon (volume d'injection) et le tampon d'analyse environnant. En conséquence, les molécules d'analyte se concentrent alors en une zone plus petite que le volume d'injection afin d'équilibrer la force ionique par rapport à celle du tampon^{5,8}. Cette méthode de préconcentration peut permettre une augmentation de la sensibilité jusqu'à un facteur de dix⁸. Finalement, à moins d'indications contraires, les tampons ainsi que les solutions standard ont été systématiquement filtrés avec des filtres Millex-FG de 0,2 µm de porosité provenant de chez Millipore (Toronto, Canada). L'impact de l'utilisation de tels filtres sur les divers analytes n'a pas été systématiquement investigué pour toutes les analyses effectuées lors de ce projet. Par contre, cela ne devrait pas dépasser les 3 % d'adsorption des analytes selon les études comparatives effectuées par certains auteurs^{41,42}. Ces études ont été effectuées pour des standards pharmaceutiques et sucres simples à l'aide de cinq à dix types de filtres dont celui qui a été utilisé en laboratoire (PTFE; Teflon) qui ont démontré des niveaux d'adsorbance d'analytes acceptables se situant entre 0 et 3,9 %^{41,42}.

3. SÉPARATION DES BARBITURIQUES

3.1 Introduction

Les barbituriques ont été utilisés comme sédatifs hypnotiques à partir de 1903⁴³. Par contre, à cause de leurs faibles indices thérapeutiques, leur utilisation pharmaceutique s'est beaucoup restreinte au profit des benzodiazépines depuis les années 60^{43,44}. En effet, malgré l'apparition de phénomènes de dépendance dans les deux cas, une surdose de benzodiazépines est moins souvent mortelle⁴⁵. Les effets secondaires, autres que la dépendance physique et psychologique, associés à l'utilisation des barbituriques sont l'hypotension, la syncope et ils peuvent aussi avoir des effets néfastes sur le fœtus à tous les stades de son développement^{43,45,46}. Par contre, certains de ces barbituriques sont toujours prescrits comme le phénobarbital (Phéno) pour le traitement de l'épilepsie quoiqu'il serait cancérigène selon son fabricant⁴³. Par ailleurs, des quatre barbituriques étudiés au cours de ce projet (voir figure 3.1), trois d'entre eux sont consommés comme drogues d'abus. En effet, l'amobarbital (Amo), le pentobarbital (Pento) et le secobarbital (Seco) sont respectivement connus sous les noms de *blue heavens*, *yellow jackets* et *red birds* et sont consommés sous forme de capsules ou de solutions injectables pour leurs effets à court terme semblables à ceux de l'alcool^{45,47}.

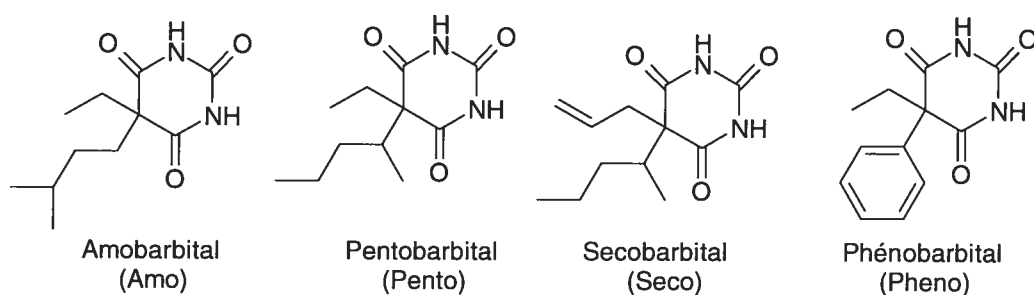


Figure 3.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation des barbituriques étudiés.

D'une manière générale, ces composés sont des analogues qui possèdent une structure hétérocyclique de base avec plusieurs chaînes latérales et leur pK_a sont situés entre 7,2 et 8,3 (fig 3.1)⁴⁸. Ces molécules peuvent adopter différentes configurations par tautomérie selon le pH auquel elles sont soumises⁴⁹. En effet, la forme cétonique serait prédominante

en solution acide alors que ce serait plutôt la forme énolique en solution alcaline. Les formes monoénoliques seraient favorisées pour des pH se situant entre 5 et 8 (voir figure 3.2) alors que les formes diénoliques et triénoliques pourraient être rencontrées pour des pH supérieurs à 8. Les propriétés physico-chimiques de ces analytes sont disponibles dans le tableau III.I. Puisque tous les pK_a de ces molécules sont connus et qu'elles sont chargées négativement en solution alcaline, leur analyse peut être effectuée en mode ÉCZ⁴⁸.

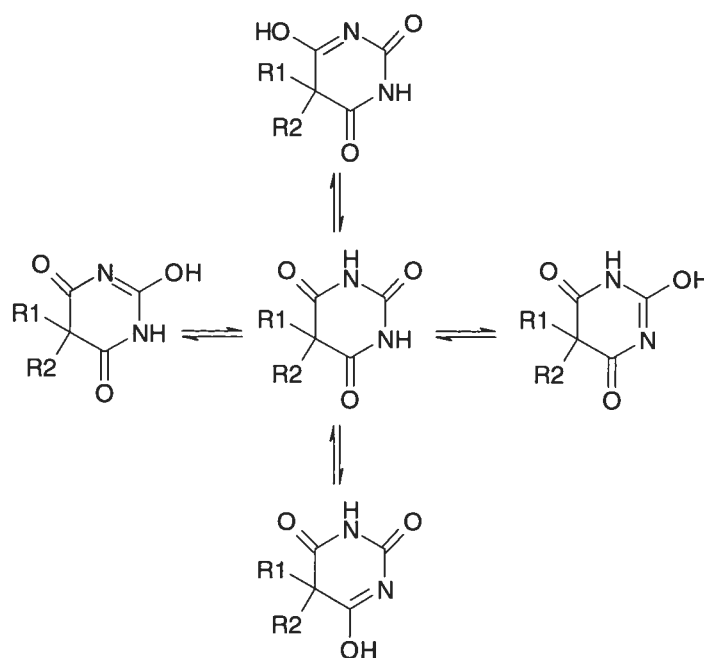


Figure 3.2 : Différentes configurations des formes monoénoliques des barbituriques.

Tableau III.I : Propriétés physico-chimiques des barbituriques^{48.50}.

Composé	MM (g/mol)	λ_{max} (nm)	pK_a	Solubilité à T_{AMB}
Amo	226,27	-	7,865	0,77 g/L dans l'eau et 0,2 g/mL dans l'alcool.
Pento	226,27	-	8,032	-
Seco	238,26	-	7,869	-
Phéno	232,23	256 (1 N NaOH)	7,365	1 g/L dans l'eau et 0,055 g/mL dans l'alcool.

Les cinq méthodes de séparation étudiées dans la littérature pour ces quatre mêmes composés utilisent des tampons borate (pH 7,5 à 8,4)⁴⁸, TRIS (pH 7,8)^{43.51} et phosphate (7,5 et 7,8)^{44.48.52}. Certaines de ces méthodes utilisaient un surfactant^{44.48.52} et le groupe de

Guan⁵² ajoutait, en plus, un solvant organique afin de modifier le FÉO. Les méthodes en mode ÉCZ utilisaient un voltage de 25 à 30 kV tandis que celles en ÉCÉM utilisaient un voltage de 20 à 30 kV^{43,44,48,51,52}. Parmi ces méthodes, trois d'entre elles ne semblaient pas avoir été maximisées pour des temps d'analyse de 9⁵¹, 17⁴⁴ et 20⁴³ min. Les deux méthodes maximisées présentaient des temps d'analyse de 4 à 9,5⁴⁸ min et de 17⁵² min. Des phénomènes de *tailing* ou de décalage dans les temps de migration ont été rapportés par certains auteurs^{43,48,51}. Puisque la séparation des barbituriques était la première méthode développée, elle a permis de standardiser nos méthodes expérimentales. En effet, la séparation maximisée des barbituriques était bien documentée. De plus, sa simplicité semblait idéale comme première séparation puisqu'elle ne requérait pas l'ajout d'additifs. Puisque l'appareil d'ÉC de Santé Canada à Longueuil n'avait jamais été utilisé avant ces essais, il semblait utile de valider une méthode autant au niveau de l'instrument que de l'expérimentateur.

3.2 Partie expérimentale

La méthode finale d'analyse sélectionnée est inspirée de celle proposée par les groupes de Bartlett⁴³ et de Weber⁵¹. Ces méthodes utilisaient un tampon TRIS de pH 7,8 sous l'influence d'un voltage de 25 kV dans un capillaire d'environ 75 cm avec une détection effectuée à 230 et 254 nm^{43,51}. Les paramètres qui ont été étudiés sont la nature du tampon et son pH (phosphate de pH 2,0; 6,7; 7,5 et 11 et TRIS-HCl de pH 7,1 à 8,9), la force ionique (6,2 à 22,0 mM), la matrice des barbituriques (5 à 30 % MeOH/eau), le temps d'injection (1 à 4 s) et le voltage appliqué (10 à 25 kV). L'ajout d'un surfactant n'a pas été testé puisque leur utilisation ne semblait pas être nécessaire.

3.3 Résultats et discussion

Les tampons testés en mode ÉCZ étaient des tampons phosphate (pH 2,0; 6,7; 7,5 et 11) et un tampon TRIS-HCl de pH 7,5. L'analyse en solution acide n'a pas été concluante puisque aucun pic n'était visible après 15 min. Cela peut être expliqué par la valeur des pK_a de ces analytes qui devraient être neutres à ce pH. Une autre explication possible est que ces analytes pourraient être beaucoup moins solubles sous forme cétonique. Les

analyses effectuées à pH 6,5 ou 11 ont aussi été peu concluantes car il y avait alors coélution de certains analytes (2 et 3 pics respectivement). Par contre, en utilisant le tampon phosphate à pH 7,5 ou le tampon TRIS-HCl, quatre pics correspondants à des anions ont été observés. Ces deux voies auraient pu être étudiées mais celle du tampon TRIS a été conservée parce qu'elle permettait d'obtenir une meilleure sélectivité pour une sensibilité équivalente.

La maximisation des conditions de la méthode a ensuite été effectuée. Cette étude a été débutée par les effets du pH et de la force ionique. Pour tous les paramètres étudiés, l'ordre de migration n'a jamais changé et les temps de migration des trois premiers analytes sont toujours restés très similaires. En général, la faible variation des temps de migration peut être expliquée par le fait que la vitesse du FÉO varie peu dans un si petit intervalle de pH. La faible différence entre les temps de migration des trois premiers analytes peut aussi s'expliquer par les structures de l'Amo, du Pento et du Seco qui sont très semblables. Quant au temps de migration du Phéno, ce dernier variait plus significativement parce qu'il possède un cycle aromatique qui a un effet électroattracteur. Cela a pour conséquence de délocaliser nettement la distribution d'une charge négative. Cet effet est visible dans le pK_a de la molécule qui est beaucoup plus acide que les trois autres barbituriques. En mode ÉCZ, un anion de grande taille devrait migrer avant un autre de petite taille. Ceci est d'autant plus vrai si sa charge est plus délocalisée dans la structure. Finalement, d'après la figure 3.3, une sélectivité maximale pour les trois analytes est obtenue en utilisant un pH entre 7,5 et 8,3 et une valeur de 8,2 a alors été retenue. Il est important de rappeler que les barres d'erreurs des graphiques des temps de migration ne sont pas représentées puisqu'elles sont inférieures à 1,1 % et sont donc plus petites que les points sur les graphiques.

L'effet de la force ionique sur le temps de migration (voir figure 3.4) et l'efficacité (voir figure 3.5) des pics des divers analytes a aussi été vérifié. Une augmentation croissante et quasi linéaire des temps de migration a été observée lorsque la force ionique du tampon augmentait jusqu'à une légère perte de sélectivité entre les trois premiers barbituriques. Par contre, une efficacité maximale a été obtenue à une valeur de 13 mM. Une augmentation de la force ionique entraîne une diminution du FÉO par la réduction de la double couche

électrique (voir équation 1.3). L'augmentation de la résolution est donc compensée par des temps de migration plus longs.

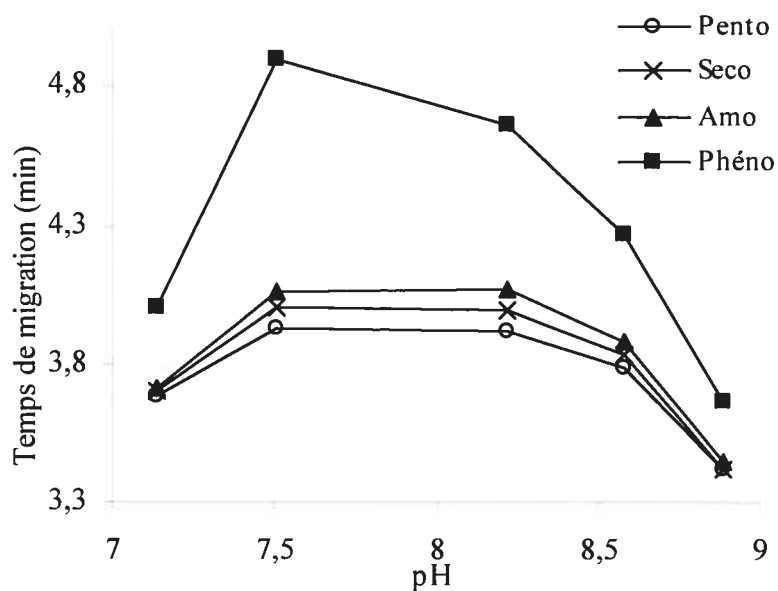


Figure 3.3 : Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des barbituriques. Tampon TRIS-HCl ($I = 13$ mM); voltage 20 kV; injection 1,5 s (50 mbar).

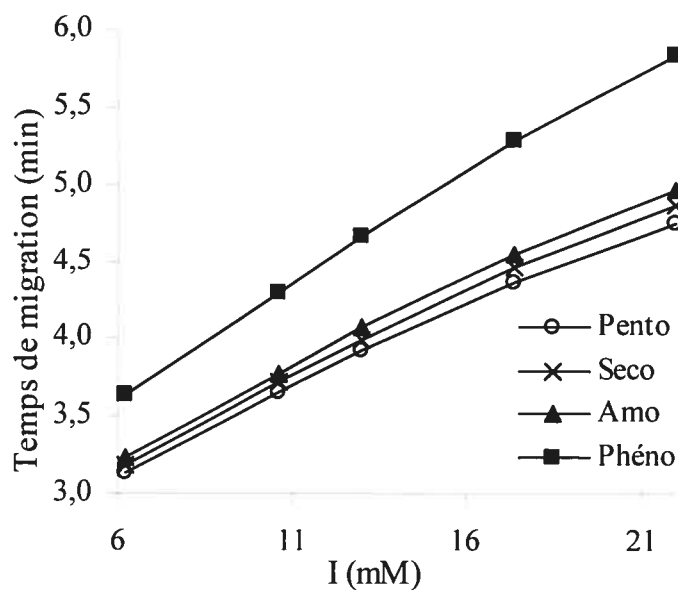


Figure 3.4 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur les temps de migration des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.

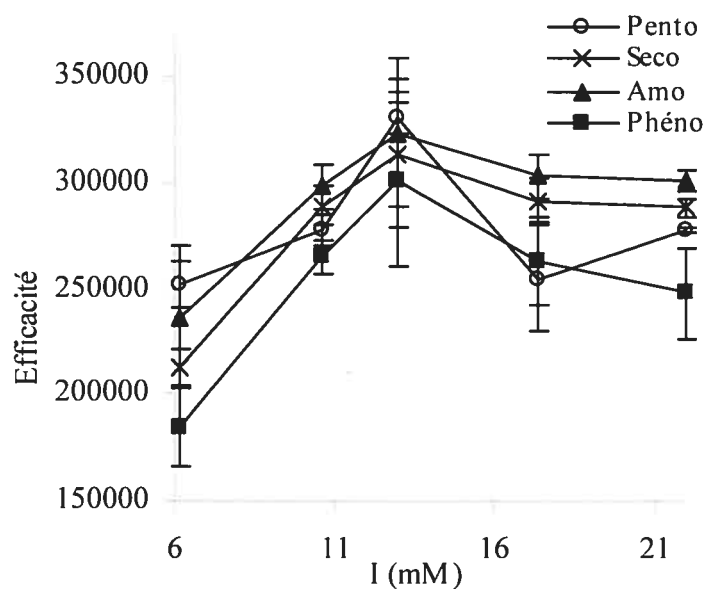


Figure 3.5 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité de séparation des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.

Les effets du voltage sur la sélectivité de la séparation et l'efficacité des pics ont aussi été étudiés. Entre 13 et 25 kV de voltage appliqué, le temps de migration des barbituriques diminuait progressivement mais l'ordre d'élution restait intact (voir figure 3.6) et les valeurs d'efficacité demeuraient relativement constantes (figure 3.7). Le voltage appliqué pour la méthode finale a été fixé à 20 kV afin d'obtenir une bonne efficacité de séparation dans un temps d'analyse de moins de 5 min. Le temps d'injection a été sélectionné à 1,5 s (2 nL) parce qu'une importante perte d'efficacité était observée pour le Phéno pour un temps plus grand. Un temps d'injection de 1 s aurait aussi pu être choisi mais a été écarté afin de conserver une meilleure sensibilité.

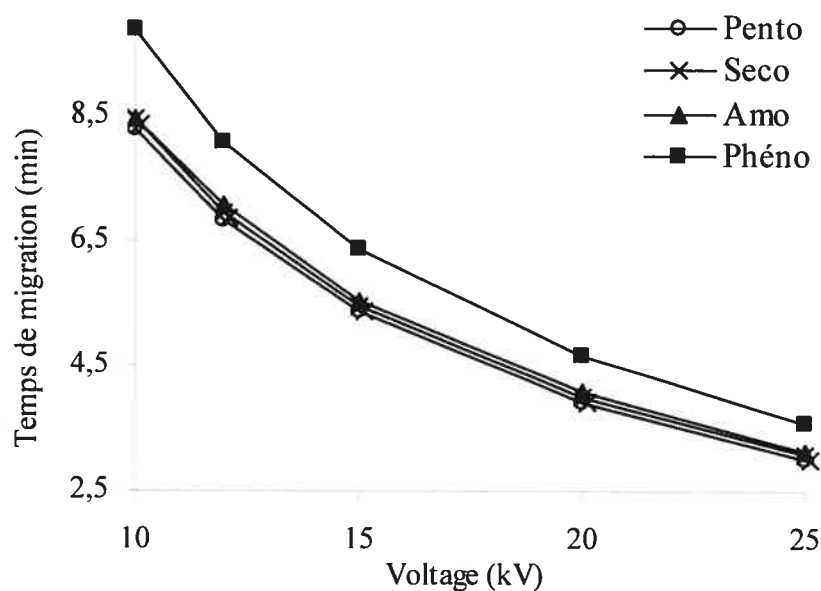


Figure 3.6 : Influence du voltage de séparation sur le temps de migration des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.

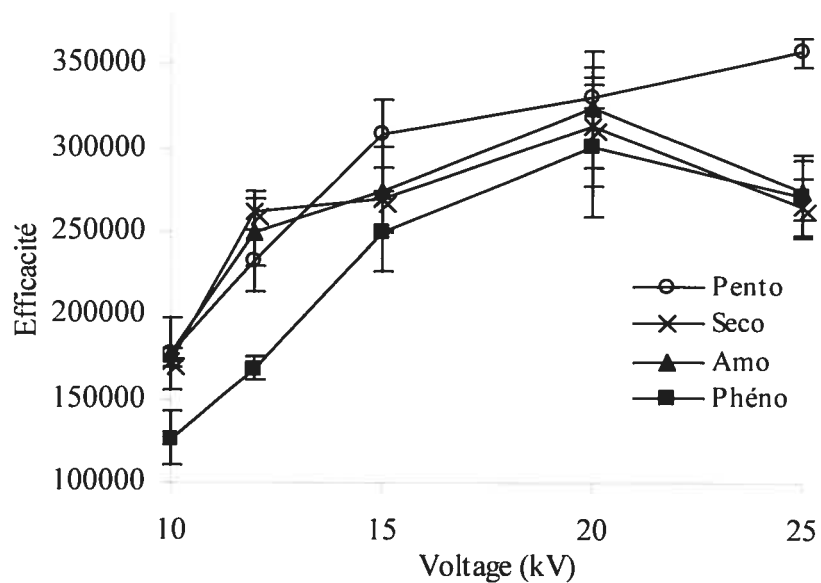


Figure 3.7 : Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des barbituriques. pH 8,2; voir figure 3.3 pour les autres conditions expérimentales.

Le dernier paramètre à avoir été maximisé est la proportion de MeOH dans la matrice des quatre standards. Cet additif servait à la fois de marqueur du FÉO et d'aide à la dissolution. Aucun additif n'a été ajouté au tampon car une sélectivité suffisante était obtenue en solution libre. Cette matrice a été sélectionnée parce que, selon le groupe de

Bartlett⁴³, elle pouvait contribuer à diminuer l'élargissement des pics causé par la plus faible conductivité de la solution. Une proportion de 20 % a été sélectionnée parce que cela semblait avoir un impact positif sur l'efficacité du Seco. Tel que mentionné précédemment, varier la conductivité de la matrice par rapport à la solution d'analyse peut créer un effet de *stacking* qui peut faire augmenter l'efficacité des pics et améliorer la LD. Les conditions de séparation de la méthode sont disponibles dans le tableau III.II. Cette méthode finale permet de séparer les quatre barbituriques avec une sélectivité suffisante ($R > 2,2$) et une très grande efficacité ($>240\,000$) en moins de 5 min. L'analyse finale pour cette séparation a été effectuée en triplicata et un exemple d'électrophérogramme est disponible à la figure 3.8. Ce nombre de réplicats aurait pu être plus élevé mais, puisque les reproductibilités obtenues sont bonnes, le choix du nombre de réplicats est justifié.

Tableau III.II : Conditions de séparation des barbituriques.

Préconditionnement :	4 min NaOH ; 2 min d'attente ; 3 min eau ; 4 min tampon		
Injection :	1,5 s à 50 mbar (2 nL)		
V / T / λ :	20 kV	25 °C	205 nm
Tampon :	TRIS (0,15 M) / HCl (0,15 M) pH 8,2 ; I = 13 mM		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,10 mM	10 % MeOH/eau	-

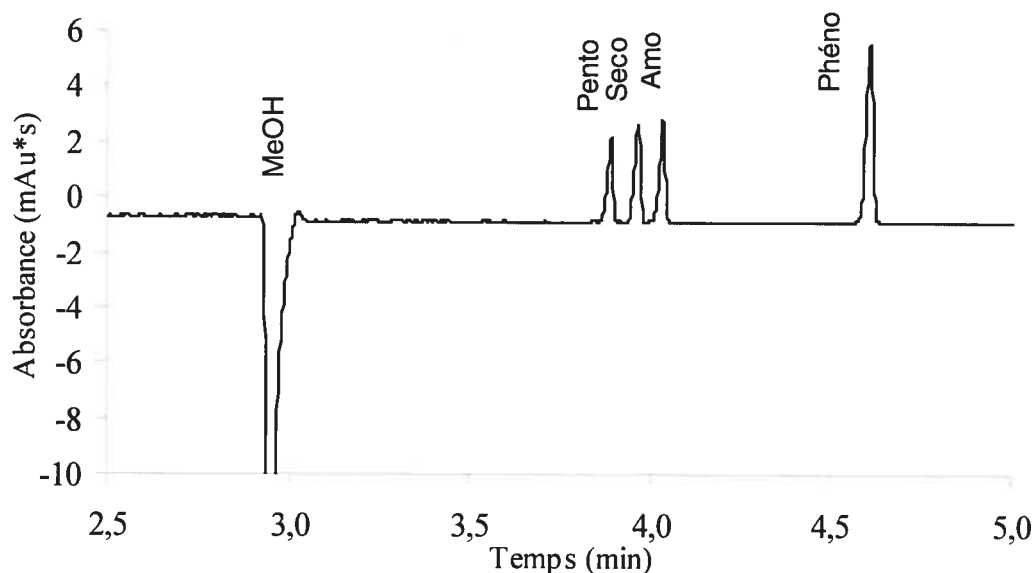


Figure 3.8 : Séparation des barbituriques (c = 0,10 mM) par ÉCZ. Tampon TRIS-HCl (pH 8,2; I = 13 mM); voltage 20 kV; injection 1,5 s (50 mbar).

Plusieurs paramètres analytiques ont été vérifiés pour l'analyse finale tels que l'efficacité, la reproductibilité, la résolution, la LD et la LQ ainsi que le domaine de linéarité. La plupart de ces résultats sont résumés dans le tableau III.III. La reproductibilité des temps de migration et des mobilités apparentes ainsi que celle des aires ont été calculées à l'aide du coefficient de variation dont les équations ont été présentées plus tôt (équation 1.6 et 1.7) ($N = 3$). Il en a résulté d'excellents coefficients de variation pour les temps de migration et les mobilités apparentes (0,03 à 0,07 %) alors que ceux de l'aire se situent autour des normes établies (1,1 à 3,4 %). De plus, l'efficacité est bonne ($>240\ 000$) et la résolution suffisante. Puisque les limites de détection devraient normalement être entre 10^{-5} - 10^{-8} M², les valeurs trouvées sont acceptables. Les domaines de linéarité de 0,01 à 0,15 mM qui ont permis le calcul des LD ont des coefficients de variation qui se situent entre 0,991 et 0,993. Ces calculs ayant été effectués à partir de la hauteur des pics. Selon Thormann et coll.⁴⁴, l'index thérapeutique de ces composés serait d'autour de 86,9 µM dans le plasma sanguin. La sensibilité de la méthode développée serait donc amplement suffisante pour doser ce type de médicament.

Tableau III.III : Résultats analytiques pour la séparation des barbituriques^a.

Composé	t_m (min)	u_{app} (10^{-4} $cm^2V^{-1}s^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (µM)	LQ ^c (µM)
Pento	3,889(1) ^d	4,157(1)	3,6(1)	-	2,4(3)	5,3(7)	18(2)
Seco	3,965(1)	4,077(1)	4,1(1)	2,5(1)	2,6(4)	5,0(6)	17(2)
Amo	4,034(1)	4,007(1)	4,4(2)	2,3(2)	2,7(5)	4,7(6)	16(2)
Phéno	4,612(3)	3,505(2)	8,8(4)	18(1)	2,4(2)	2,6(3)	8(1)

^a $N = 3$; ^b LD = $3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c LQ = $10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d(s) : 3,889(1) = $3,889 \pm 0,001$

Les résultats de la méthode finale peuvent être comparés avec ceux des méthodes décrites par les groupes de Weber⁵¹ et de Bartlett⁴³ puisqu'elles sont relativement similaires quoique aucune de ces deux méthodes n'ait été maximisée. Les auteurs ont obtenu des LD de 1 µM et de 5 µg/g, des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99 et des reproductibilités de l'aire variant entre 1,5 et 6,6 % pour des séparations de 9 et de 20 min respectivement^{43,51}. Il peut donc en être déduit que la méthode présentée dans le cadre de ce projet est plus rapide avec des résultats analytiques équivalents à l'exception de la LD qui est légèrement inférieure. Les autres groupes^{44,48,52} ont obtenu des LD de l'ordre du micromolaire, des coefficients de corrélation de 0,999, des efficacités supérieures à 200 000 et une reproductibilité des temps de migration entre 6,7 et 16,7 % pour des séparations de 4

à 17 min^{44,48,52}. L'ensemble de ces résultats montre bien que la méthode développée permet de standardiser nos méthodes expérimentales parce qu'elle est équivalente à la littérature étudiée. L'utilisation de ce nouvel appareil et son usage par l'expérimentateur peut donc être considéré valide. De plus, la méthode d'identification par CLHP/UV développée par Santé Canada pour ces mêmes analytes était peu stable puisqu'un nombre de pics supérieur et variable au nombre d'analytes étaient visibles pour un temps d'analyse de 16 min. Cette méthode est réalisée selon les conditions suivantes : colonne X-Terra RP8 3,5 mm 3,9×100 mm; phase mobile en mode gradient ACN-eau/MeOH-MeOH-0,025 M KH₂PO₄; 0,6 mLmin⁻¹; 25 °C; injection 10 µL.

3.4 Conclusion

La méthode de séparation de barbituriques par ÉCZ présentée au cours de ce chapitre est efficace, rapide et possède une sensibilité suffisante pour de nombreuses applications selon l'index thérapeutique de ces composés⁴⁴. En outre, elle est plus robuste que la méthode par CLHP/UV de Santé Canada. La simplicité de la méthode développée a permis de valider ce nouvel appareil et son utilisation par les résultats qui ont été obtenus.

4. SÉPARATION D'ANTIVIRAUX

4.1 Introduction

Les drogues antivirales telles que la zidovudine (AZT), la lamivudine (3TC), la zalcitabine (ddC), la stavudine (D4T) et le didanoside (ddI) sont utilisées dans le traitement du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La contraction de ce virus entraîne une maladie mortelle qui est le syndrome d'immunodéficience acquise (sida) qui détruit progressivement le système immunitaire en s'attaquant aux globules blancs dans le sang. Le malade devient alors susceptible de contracter une multitude de maladies opportunistes dont le cancer. Depuis le premier cas déclaré au Canada en 1982, Santé Canada estime le nombre de sidéens à 20 000 Canadiens⁵³. La nécessité d'une méthode de séparation alternative à la CLHP pour les antiviraux est importante pour le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada afin de déterminer la qualité des antiviraux disponibles commercialement. Cela l'est d'autant plus que ces médicaments sont généralement prescrits sous la forme de trithérapie⁴⁰. La méthode d'identification par CLHP de Santé Canada pour le 3TC, le D4T, l'AZT et le ddI résultait en la coélution du D4T et du ddI selon les conditions données au chapitre précédent.

Tels qu'illustrés à la figure 4.1, trois des antiviraux font partie du groupe des 2',3'-dideoxynucléosides (ddN) soit le ddI, le ddC et l'AZT. En effet, leur squelette de base est le même, c'est-à-dire un sucre D-2-déoxyribose avec une base hétérocyclique du type purine ou pyrimidine. Ils diffèrent entre eux selon le groupement attaché au C3 ainsi que la base au C1⁵⁴. Les deux autres composés soit le D4T et le 3TC sont aussi des analogues des nucléosides mais possèdent des différences structurales plus importantes dans leur sucre respectif soit une liaison double ou la présence d'un atome de soufre. Tous ces composés ont en commun une structure similaire à celles des nucléosides compris dans l'ADN qui leur permet d'intervenir en ralentissant le processus de reproduction du virus par l'absence d'un groupement hydroxyle en position 3'⁵⁴.

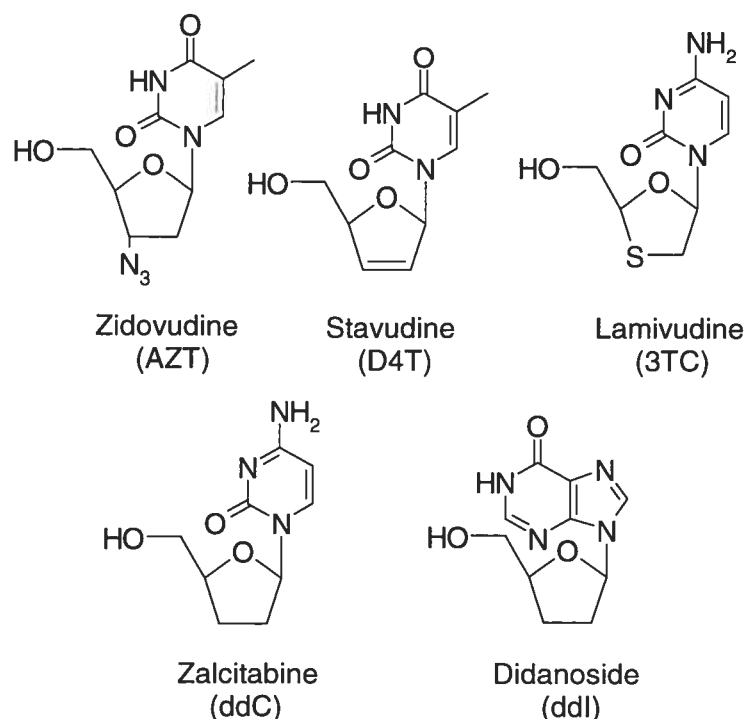


Figure 4.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation des antiviraux étudiés.

Puisque leurs structures sont similaires, certaines de leurs propriétés physico-chimiques sont comparables. Par exemple, elles ont une taille semblable mais surtout les pK_a connus de trois de ces analytes sont similaires (voir tableau IV.I). Puisque trois de ces analytes auront des rapports q/MM similaires et que deux des analytes ont des pK_a non rapportés, il est possible qu'une séparation en mode ÉCZ soit plus ardue. Étant donné que tous ces analytes absorbent dans une même région du spectre UV-visible, le choix d'une longueur d'onde de détection est facilité.

Tableau IV.I : Propriétés physico-chimiques des antiviraux^{50,55}.

Composé	MM (g/mol)	λ_{max} (nm)	pK_a	Solubilité à T_{AMB}
ddC	211,22	280 (1 N HCl) 270 (1 N NaOH)	-	-
3TC	229,26	-	-	~70 mg/mL dans l'eau.
D4T	224,21	266	9,8	-
AZT	267,24	266,5	9,8	25 mg/mL dans l'eau.
ddI	236,23	248 (pH 2) 254 (pH 12)	9,1	200 mg/mL dans le DMSO.

Plusieurs méthodes de séparation sont disponibles dans la littérature pour certains ou plusieurs de ces analytes. Leur séparation peut être effectuée par CLHP avec détection par spectroscopie d'absorption UV-visible, par spectrométrie de masse ou par *radioimmunoassay* et par électrophorèse capillaire avec détection par spectroscopie d'absorption UV-visible ou par spectrométrie de masse. La séparation des nucléosides par CLHP est utilisée depuis plus de trente ans⁸. Il s'agit donc d'une méthodologie établie dont les temps d'analyses varient entre 4 et 17 min pour des séparations en phase à polarité inversée ou par pairage ionique⁵⁶⁻⁶⁰. Par contre, l'utilisation de cette instrumentation entraîne tout de même des limitations telles que le coût des colonnes et des solvants nécessaires avec une efficacité variable et des temps d'analyse qui peuvent être particulièrement longs selon les conditionnements à effectuer comme pour les méthodes de pairage ionique (plus de 1 h par analyse)^{57, 60, 61}.

Les méthodes de séparation par ÉC décrites dans la littérature sont très variées. Un des premiers tests sur la séparation de nucléosides par électrophorèse capillaire a été effectué en 1987 par Cohen et coll.⁶². Cette méthode séparait d'autres nucléosides ainsi que des oligonucléotides avec une méthode ÉCÉM dans un tampon TRIS-phosphate où des ions métalliques divalents tels que le magnésium et le cuivre avaient été ajoutés afin d'améliorer la séparation des oligonucléotides en changeant la sélectivité des micelles de SDS⁶². Les autres séparations de nucléosides utilisaient des tampons tels que phosphate (pH 2,5 à 9,2)^{8,40,61,63}, borate (pH 9,2)⁸, CAPS (pH 11)⁸, carbonate (pH 9,6)⁸ et une solution électrolytique d'acide formique/ammoniaque (pH 2,5 et 10)^{55,64}. Les additifs utilisés étaient le DTAB⁶¹, le CTAB⁸, le *N,N*-diméthyl-octylamine⁴⁰, le SDS⁶⁰ et l'EDTA. La taille des capillaires variait entre 37 et 56 cm et le voltage entre 12 et 25 kV^{8,40,55,60,61,63,64}. Parmi ces méthodes, la majorité d'entre elles séparaient aucun^{61,64}, un⁸ ou deux^{40,55,63} des cinq nucléosides à analyser dans ce projet. De plus, certaines des méthodes proposées par ces groupes ne semblaient pas être maximisées ou optimisées^{8,61} ou, encore, elles l'étaient mais pour d'autres nucléosides^{63,64}. Quant à elle, la méthode de Singhal⁶⁰ analysait quatre des cinq analytes d'intérêt pour ce projet. Par contre, aucune maximisation n'a été mentionnée et deux des résolutions entre des paires d'analytes d'intérêts étaient inférieures à 1,5 pour une séparation de 9 min. La séparation des antiviraux présentée devait donc être complétée et améliorée.

4.2 Partie expérimentale

Plusieurs essais ont été effectués afin de maximiser les paramètres de la séparation dans le but de développer une méthode de séparation efficace pour les cinq antiviraux. Parmi les méthodes disponibles dans la littérature, une des méthodes semblait être plus efficace et a donc été testée en premier⁵⁵. Effectivement, la méthode finale s'est avérée être une variation de la méthode de Cahours et coll. présentée en 2002⁵⁵. Cette méthode avait été priorisée parce qu'il semblait préférable d'utiliser un tampon avec un pH supérieur au pK_a rapporté (voir tableau IV.I) afin de séparer des analytes chargés. De plus, cette méthode pouvait ensuite être compatible avec un détecteur SM/SM et l'appareil disponible en laboratoire pouvait éventuellement être couplé avec ce type de détecteur⁵⁵. Cette méthode consistait à séparer divers analytes dont l'AZT, le D4T, le 3TC et le ddI à l'aide d'un tampon acide formique/ammoniaque de pH 10 d'une force ionique de 50 mM dans un capillaire d'une longueur de 67 cm sous l'influence d'un voltage de 25 kV avec la détection effectuée à 254 nm.

Les paramètres qui ont été testés pour la solution électrolytique sont le pH (9,0 à 10,3), la force ionique (12,5 à 43,0 mM) et la quantité de surfactant SDS (25 à 85 mM). Le voltage a aussi été varié de 15 à 25 kV et le temps d'injection de 1 à 4 s à 50 mbar. Il est important de mentionner que la solution électrolytique finale (acide formique/ammoniaque) n'est pas réellement un tampon puisque son pH est extrêmement éloigné de sa zone de pouvoir tampon. Parmi les paramètres étudiés, la matrice de l'échantillon a aussi été variée. En effet, diverses dilutions de la solution électrolytique sans additif, l'électrolyte de fond (ÉDF), ont été utilisées. Les combinaisons testées étaient constituées de 25 à 75 % d'ÉDF dans l'eau. Plusieurs marqueurs de FÉO tels que l'oxyde de mésityle, le DMSO et l'acétone ont aussi été testés dans la matrice sélectionnée. Finalement, des essais ont aussi été effectués pour le préconditionnement à utiliser pour l'analyse finale.

4.3 Résultats et discussion

Puisque la séparation des barbituriques en mode ÉCZ avait été concluante, les premiers tests ont été effectués initialement en mode ÉCZ sur quelques analytes seulement. Les

conditions choisies pour ce mode étaient une solution d'acide formique/ammoniaque de pH 10,3 avec une force ionique de 50 mM, un voltage de 25 kV et un temps d'injection de 4 s à 50 mbar. Les standards ont été dissous dans un mélange de 50 % ÉDF/eau et plusieurs marqueurs de flux ont été ajoutés. Les premières analyses en solution libre ont démontré que le 3TC était effectivement un composé qui ne portait pas de charge à un pH de 10,3. Des expériences ultérieures ont ensuite démontré qu'il en était de même pour le ddC. Il y avait donc coélution de ces deux analytes neutres en mode ÉCZ. Les trois autres analytes étaient de nature anionique et migraient après le FÉO. Les premiers à migrer étaient le D4T et l'AZT avec une résolution inférieure à 1,5 puisque leurs pK_a sont identiques. Le ddI était le dernier à migrer puisque sa charge anionique était la plus grande à ce pH selon son pK_a . Un changement de mode devait donc être effectué afin de pouvoir séparer tous les analytes à la fois. Ces premiers résultats ont aussi démontré qu'une détection à 254 nm n'était pas aussi sensible qu'à 260 nm. Cette conclusion peut aussi être tirée de l'étude de l'influence du pH sur les propriétés spectrales réalisée par Singhal et coll.⁶⁰. Les résultats obtenus relatifs au marqueur de flux indiquaient que l'oxyde de mésityle n'était pas très soluble dans la solution standard employée, ce qui compliquait son utilisation. Le DMSO a plutôt été préféré à l'acétone puisque ce dernier est beaucoup plus volatile, ce qui aurait pu causer des erreurs lors de dosages.

Sachant qu'une séparation partielle était obtenue par ÉCZ, la méthode a été adaptée au mode ÉCÉM en ajoutant un surfactant. Tel que mentionné au premier chapitre, l'ajout d'un surfactant crée une phase pseudo-stationnaire où les composés neutres peuvent être séparés d'après leur hydrophobicité selon un mécanisme de partage. La rétention des analytes devient alors affectée par trois facteurs reliés à la relation analyte-micelle⁶⁵. Ces facteurs sont la mobilité propre de l'analyte par rapport à sa charge, la distribution de phase dans la phase pseudo-stationnaire et la formation de paires d'ions avec le surfactant⁶⁵. Le SDS a été le premier surfactant à être testé parce qu'il est le plus communément employé dans la littérature⁷. Il possède l'avantage de ne pas inverser la direction du FÉO et ses propriétés physico-chimiques sont bien connues en EC⁷. Par exemple, sa CMC est de 8 mM dans l'eau et le pH doit être au-dessus de 6,0 pour que les micelles migrent vers la cathode grâce au FÉO^{2,7}. Les premiers essais utilisant le SDS ont immédiatement montré une grande sélectivité. En effet, les cinq analytes y étaient clairement séparés. De plus, cette sélectivité est meilleure que celle de la méthode de Singhal⁶⁰ qui séparait quatre des cinq

antiviraux sélectionnés avec deux résolutions inférieures à 1,5 pour un temps d'analyse plus long. Cette méthode était donc prometteuse et a ensuite pu être maximisée afin d'obtenir les meilleurs résultats que possible.

Certains des paramètres analytiques étudiés lors de la maximisation avaient une plus grande influence sur la séparation que d'autres. En effet, le temps de migration de certains analytes (ddI et D4T) augmentait légèrement avec le pH de la solution électrolytique (voir figure 4.2). Ce phénomène est peu prévisible parce que, théoriquement, une faible augmentation du pH entre 9 et 10 ne devrait pas ou peu influencer le FÉO selon le pK_a de la silice. Expérimentalement, cet effet est plus marqué pour les pH de 9 et de 10,3 mais surtout pour le ddI dont le temps de migration est le plus long. Les temps de migration du ddC, du 3TC et de l'AZT sont moins longs et sont restés globalement plus constants. Pourtant, les structures de ces analogues ne comportent pas de différences notables qui pourraient expliquer ce phénomène. Le pH qui a été choisi pour effectuer l'analyse était de 10,0 afin d'obtenir une meilleure résolution et un temps d'analyse légèrement plus court qu'à une valeur de 10,3. De plus, une valeur de 9,0 a été écartée malgré une réduction du temps d'analyse puisque les pics possédaient une asymétrie beaucoup plus grande.

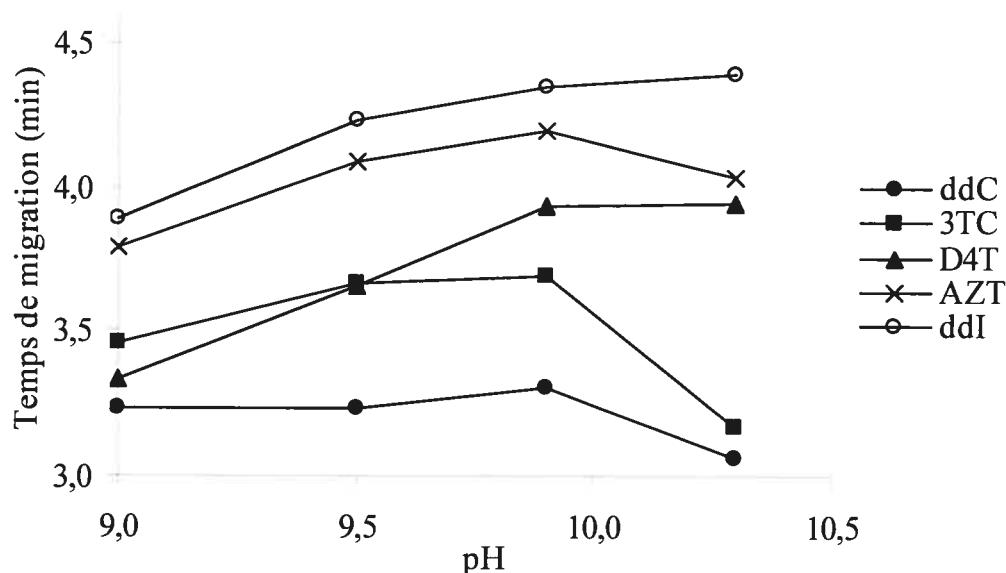


Figure 4.2 : Influence du pH de la solution électrolytique sur les temps de migration des analogues antiviraux. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque ($I = 25$ mM), SDS 75 mM; voltage 20 kV; injection 3 s (50 mbar).

L'effet de la variation de la force ionique sur l'efficacité du pic a aussi été investigué pour un des analytes. Il a été observé que lorsque la force ionique de la solution électrolytique était augmentée de 25 à 43 mM, l'efficacité (N) du pic de D4T diminuait considérablement. En effet, elle diminuait de plus de la moitié de sa valeur : de 132 500 à 55 000. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la solution électrolytique utilisée pour la séparation n'est pas un tampon. En effet, le pK_a de l'acide formique se situe autour de 3,74 et sa zone tampon est donc située à $pK_a \pm 1$ ¹⁸. Le pouvoir tampon de cette solution utilisée à un pH de 10,3 est donc très faible ou absent. De plus, pour obtenir un pH aussi grand, une quantité considérable d'ammoniaque doit être ajoutée. Pour des solutions de forces ioniques croissantes, la grandeur du courant ionique observée augmentait alors fortement (de 53 à 74 μA). Cela signifie que la quantité d'espèces présentes dans la solution génère une conductivité très grande. Par contre, la loi de Ohm est toujours respectée² avec un coefficient de corrélation de 0,979 et une relation inversement proportionnelle entre le voltage et le temps de migration suggère peu d'effet Joule. Puisqu'un voltage de 22,5 kV ou de 25 kV entraînait des courants élevés (84 et 92 μA) et qu'à 20 kV, l'efficacité des pics étaient minimale pour plusieurs analytes (voir figure 4.3), un voltage final de 15 kV a été choisi. De plus, les valeurs d'efficacité semblaient peu constantes à 25 kV par rapport aux autres voltages, peut-être à cause de l'instabilité d'un courant de valeur si élevée. Le choix de la valeur de la force ionique a aussi été influencé par la grandeur du courant et une valeur de 25 mM a été choisie pour une efficacité maximale du D4T puisqu'il avait la valeur la plus faible. L'influence du temps d'injection sur l'efficacité des pics de 3TC et ddC a aussi été testée. Ces deux analytes ont été ciblés parce que leurs efficacités étaient les plus faibles par rapport à l'ensemble des analogues. Les résultats de cette étude ont démontrés qu'il était plus avantageux par rapport à la sensibilité et à l'efficacité que l'injection soit effectuée pendant 3 s à 50 mbar, ce qui correspond à une injection de 5 nL.

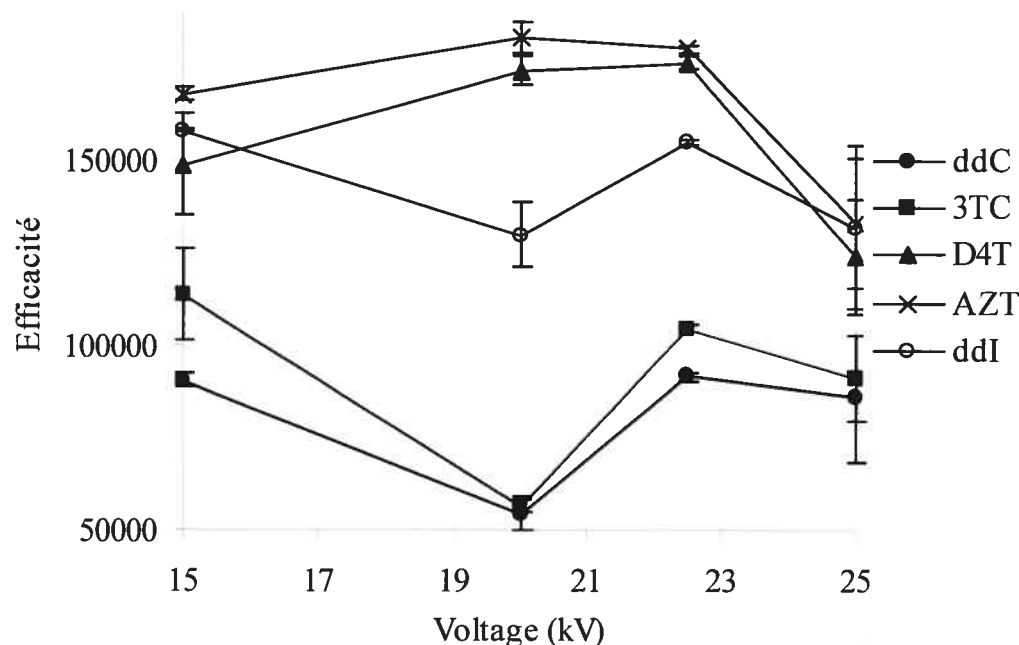


Figure 4.3 : Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des pics des analogues antiviraux. pH 10,3; voir figure 4.2 pour les autres conditions expérimentales.

Un autre paramètre étudié a été la quantité de surfactant présent dans la solution électrolytique sur les temps de migration (figure 4.4). Sa présence est ici nécessaire puisqu'elle permet la séparation de deux composés non chargés soit le 3TC et le ddC du FÉO. Les expériences montraient l'obtention de temps d'analyse constants et courts (moins de 4,5 min) pour une concentration de 25 à 75 mM. Une sélectivité maximum était toutefois observée pour 50 mM. Cette concentration avait aussi une influence sur le courant pendant l'analyse. En effet, ce dernier variait entre 65 et 85 μA sur l'intervalle étudié. Il est aussi intéressant de noter par cette figure qu'aucune inversion de l'ordre de migration n'est observée dans le domaine étudié. Contrairement à ce qui est attendu, les analytes neutres (3TC et ddC) sont les premiers à migrer. Il est possible que ces petites molécules polaires soient peu influencées par la présence de SDS. Le ddI est toujours le dernier anion à migrer car la valeur de son pK_a est la plus petite par rapport au pH. La présence de SDS dans la solution influence aussi la sélectivité entre le D4T et l'AZT en inversant leur ordre d'élution par rapport au mode ÉCZ.

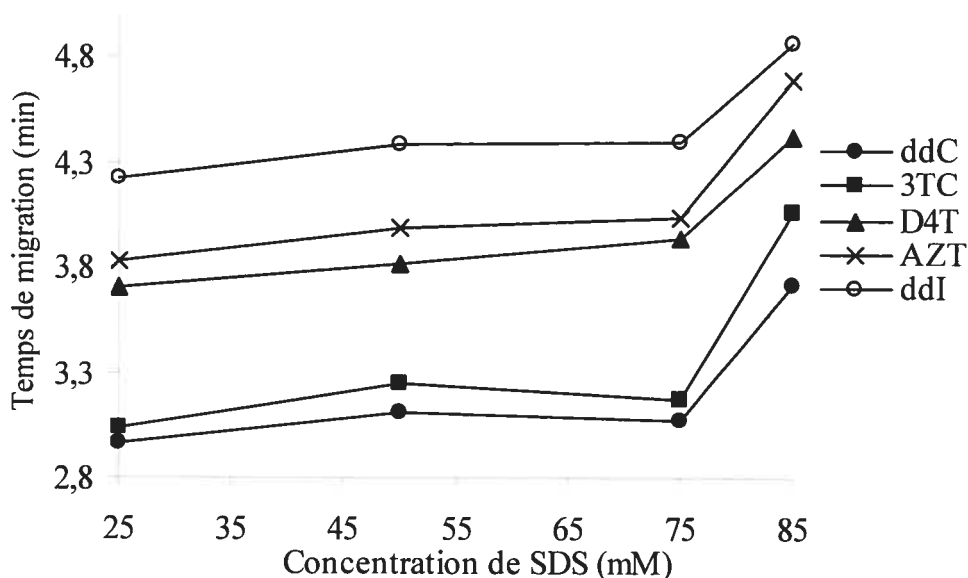


Figure 4.4 : Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des analogues antiviraux. pH 10,3; voir figure 4.2 pour les autres conditions expérimentales.

Les derniers paramètres analytiques à être investigués ont été la composition de la matrice des cinq analogues ainsi que le préconditionnement. Dans le cas présent, les effets de la matrice ont été étudiés sur le pic du D4T. La composition finale de la matrice a été choisie comme étant de 50 % de la solution électrolytique (ÉDF) dans de l'eau puisque l'efficacité du D4T y était maximale. Le marqueur du FÉO a été choisi comme étant le DMSO dans une proportion de 2,5 % selon les explications données auparavant. Cette matrice était avantageuse pour favoriser les effets de *stacking* puisqu'elle est de plus faible conductivité. De plus, la quantité de solvant utilisée était minimale selon l'hypothèse qu'une trop grande quantité de solvant organique ou une nature trop différente de celle de la solution électrolytique peut résulter en la perturbation du milieu des micelles⁶⁶. En ce qui concerne le préconditionnement (voir tableau IV.II pour les conditions après maximisation), une méthode sans hydroxyde de sodium en mode ÉCÉM donnait une reproductibilité légèrement plus grande pour plus de la moitié des analytes. Par contre, la présence d'hydroxyde de sodium a été conservée pour les séparations en mode ÉCZ. Un exemple d'électrophérogramme pour l'analyse finale de cette séparation est disponible à la figure 4.5.

Tableau IV.II : Conditions de séparation des antiviraux.

Préconditionnement :	3,5 min solution électrolytique ; 2 min d'attente ; 3,5 min solution électrolytique		
Injection :	3,0 s à 50 mbar (5 nL)		
V / T / λ :	15 kV	25 °C	260 nm
Solution électrolytique :	HCOOH (50 mM) / NH ₄ OH (188 mM) pH 10,0 ; I = 25 mM ; SDS (50 mM)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,25 mM	50 % EDF/eau (V/V)	2,5 % DMSO (V/V)

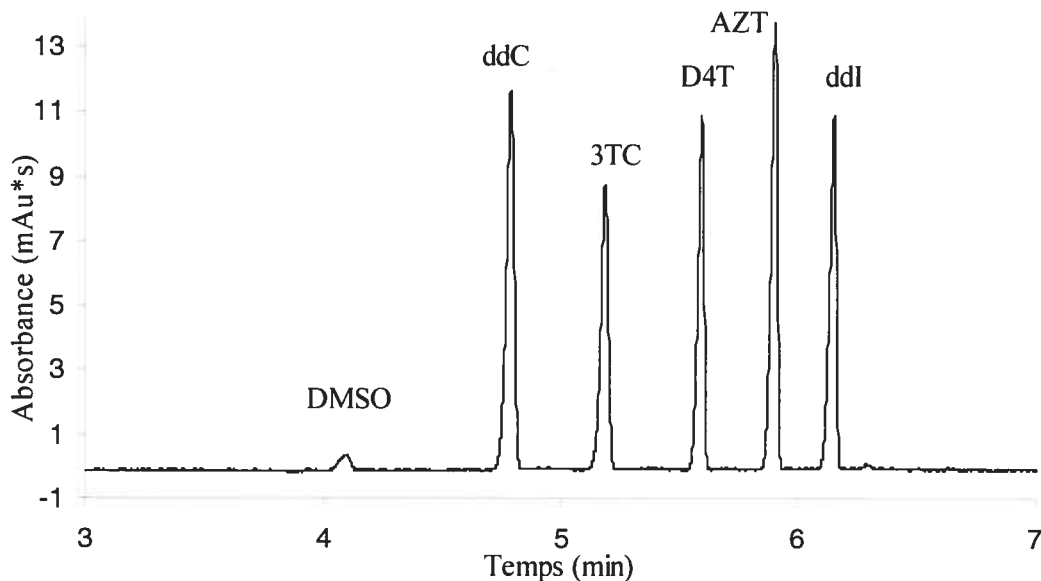


Figure 4.5 : Séparation des analogues antiviraux (c = 0,25 mM) par ECCEM. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (pH 10,0; I = 25 mM), SDS 50 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).

Pour le calcul des paramètres analytiques, le même processus que pour les barbituriques (chapitre 3) a été suivi par rapport aux nombres de répétitions effectuées pour l'analyse finale et la courbe de sensibilité. Les mêmes paramètres ont aussi été calculés à partir des résultats expérimentaux tirés de l'analyse finale (voir tableau IV.III). L'efficacité pour le D4T, le ddl et l'AZT sont toutes très bonnes puisqu'elles dépassent les 175 000 plateaux théoriques. Par contre, celles des deux autres analytes sont moindres puisqu'elles se situent autour du minimum attendu normalement pour cette instrumentation³. La résolution entre les analytes de valeur est amplement suffisante (valeurs allant de 4,8 à 7,5) et ce, pour un temps d'analyse très court (6,5 min). La grande sélectivité de la méthode pourrait permettre l'analyse d'un mélange de plus d'un composé antiviral où l'un des constituants serait présent à l'état de trace. Les reproductibilités des temps de migration et des mobilités

apparentes sont de 0,3 à 0,5 % et celles de l'aire sont de 0,9 à 1,3 % pour les cinq antiviraux étudiés. Les diverses reproductibilités de ces résultats expérimentaux sont donc excellentes. Les LD obtenues pour cette méthode sont toutes dans l'ordre de grandeur attendu. Les résultats obtenus pour le domaine de linéarité sur un intervalle de concentration de dix (0,04 à 0,42 mM) ont donné des facteurs de corrélations entre 0,991 et 0,997, ce qui a été jugé comme étant satisfaisant.

Tableau IV.III : Résultats analytiques pour la séparation des antiviraux^a.

Composé	t _m (min)	u _{app} (10 ⁻⁴ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	A (mAu*s)	R	N (10 ⁵)	LD ^b (μM)	LQ (μM)
DdC	4,79(2) ^d	4,54(2)	26,9(2)	-	0,94(9)	2,2(6)	7,3(2)
3TC	5,18(3)	4,20(2)	20,0(1)	6,2(2)	1,03(6)	1,8(5)	6,0(1)
D4T	5,59(2)	3,89(1)	19,9(3)	7,3(5)	2,0(2)	1,5(4)	4,9(1)
AZT	5,90(3)	3,69(2)	25,6(3)	6,1(1)	2,23(1)	1,3(3)	4,5(1)
ddI	6,15(3)	3,54(2)	21,9(4)	4,69(4)	1,91(9)	1,0(3)	3,51(9)

^a N = 3 ; ^b LD = 3 x (DS/(dR/dC)) ; ^c LD = 10 x (DS/(dR/dC)) ; ^d(s) : 4,79(2) = 4,79 ± 0,02

4.4 Conclusion

Cette méthode analytique employant du SDS a été inspirée de celle de Cahours et coll. présentée en 2002 pour deux des analytes d'intérêt⁵⁵. Par comparaison, la méthode de ÉCÉM développée est autant sinon plus performante que celle de Cahours et coll.⁵⁵ En effet, son groupe a obtenu une résolution et une efficacité respectivement plus grande que 1,5 et que 260 000 pour un temps d'analyse similaire pour l'AZT et le D4T⁵⁵. La résolution de la méthode présentée dans le cas présent est donc supérieure mais son efficacité est inférieure pour les deux mêmes analytes. Selon les informations disponibles, la LD obtenue par Cahours avec le même type de détecteur est d'environ 0,125 μg/mL pour l'AZT et d'environ 1 μg/mL pour le D4T⁵⁵ alors que celle présentée ici est de 0,3 μg/mL.

Pour Santé Canada, l'ÉC est donc une alternative intéressante à leur méthode d'identification du 3TC, D4T, AZT et ddI par CLHP qui résulte en une coélution partielle telle que mentionnée précédemment. Cette grande sélectivité pourrait permettre l'analyse de traces d'un analogue dans un médicament contenant plus d'un ingrédient actif. Ces éléments valident la pertinence de l'analyse ainsi que la méthode choisie. Il serait

intéressant, lors d'études futures, d'appliquer cette méthode sur un appareil couplé à un SM afin d'améliorer davantage la LD, permettant ainsi le dosage de plasmas ou d'échantillons provenant de sources environnementales.

5. SÉPARATION DE TÉTRACYCLINOÏDES

5.1 Introduction

Le traitement des infections bactériologiques est une préoccupation très importante depuis fort longtemps. Selon Santé Canada, 217,9 millions de doses quotidiennes d'antibiotiques ont été prescrites pour la période d'avril 2000 à mars 2001, soit l'équivalent d'une dose quotidienne par cinquante Canadiens⁶⁷. Lors de ce projet, deux séries d'analogues d'antibiotiques distincts ont été analysées par ÉC : les tétracyclinoïdes et les pénicillines. Selon les données recueillies par le programme intégré Canadien de surveillance de la résistance aux antibiotiques (PICRA)⁶⁷, cette première catégorie d'antibiotiques est importante parce qu'elle représente environ 14 % des prescriptions pour l'année 2001. Les tétracyclinoïdes servent surtout à traiter des maladies cutanées chez l'humain, certaines infections bactériennes animales et auraient aussi des applications dans la préservation des fruits et légumes et dans l'extermination d'insectes nuisibles^{67,68,69}.

La structure générale des tétracyclinoïdes dérive d'une base rigide du type hydrotétracène qui possède un grand nombre de groupements fonctionnels (voir figure 5.1)⁶⁹. La présence de ces groupements fonctionnels accorde des propriétés acido-basiques aux molécules qui se traduisent par un caractère amphotérique avec un point isoélectrique situé autour de 5,5 et par une grande solubilité dans l'eau et les solvants polaires^{68,69}. Les quatre grands groupements ionisables dans leur structure sont : un groupement phénolique sur le cycle D (pK_a 10,7), un groupement diméthylamino sur le cycle A (pK_a 9,5), un groupement dicétone phénolique entre le cycle B et C (pK_a 7,7) et un groupement hydroxyle dans le système tricarbonylméthane du cycle A (pK_a 3,3)^{69,70}. Lorsqu'un tétracyclinoïde est mise en solution à un pH situé entre 3,3 et 7,5, il s'y trouve alors majoritairement sous une forme zwitterionique⁷¹. Il aurait aussi tendance à former une paire de zwitterion avec l'EDTA à ce pH. La structure de cet additif est disponible à la figure 5.2. Certains tétracyclinoïdes auraient toutefois tendance à se dégrader en solution acide^{72,73}. Seule la chlortétracycline serait instable dans des conditions alcalines mais elle n'a pas été analysée^{72,73}. Une méthode de séparation en milieu basique a donc été privilégiée afin de séparer les tétracyclinoïdes sous leurs formes chargées. Les

groupements fonctionnels de ces analogues par rapport à la structure générale de la figure 5.1 sont disponibles au tableau V.I.

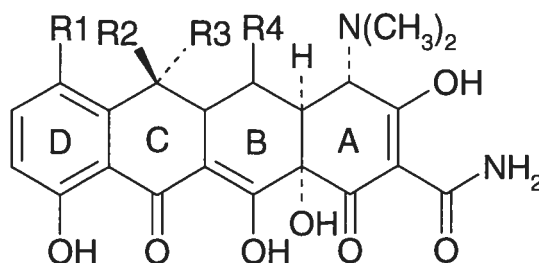
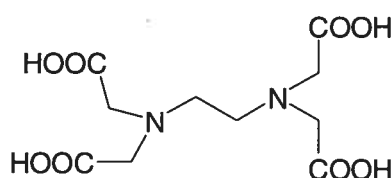


Figure 5.1 : Structure générale des tétracyclinoïdes étudiées.



Acide éthylènediaminetétraacétique
(EDTA)

Figure 5.2 : Structure moléculaire, nom et abréviation du EDTA.

Tableau V.I : Nom, abréviation, groupements fonctionnels et propriétés physico-chimiques des tétracyclinoïdes⁵⁰.

Composé	MM (g/mol)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	λ_{\max} (nm)	pK _a	Solubilité à T _{AMB}
Doxycycline ^a (Doc)	462,45	H	H	CH ₃	OH	267, 351 (0,01 N HCl/MeOH)	-	-
Tétracycline ^b (Tc)	480,90	H	OH	CH ₃	H	-	-	Soluble dans l'eau et le MeOH.
Minocycline ^b (Mnc)	493,94	N(CH ₃) ₂	H	H	H	263, 352 (0,1 N HCl) 243, 380 (0,1 N NaOH)	-	-

^a H₂O ; ^b HCl

Un grand nombre de méthodes de séparation sont disponibles dans la littérature pour les tétracyclinoïdes. Des techniques de séparation par CLHP existent depuis plus de vingt ans pour ces analytes⁷⁴. Par contre, l'utilisation de la technique d'ÉC pour l'analyse des tétracyclinoïdes est plus récente, soit depuis 1991 par Yeo et coll.⁷⁵. D'autres méthodes

telles que des analyses microbiologiques ou de spectrophotométrie ont aussi été utilisées⁶⁹. Les méthodes de séparation par CLHP étudiées ont été réalisées par chromatographie à phase inversée ou par pairage ionique avec des temps de séparation allant de 5 à 35 minutes^{71-74.76.77}. Les méthodes de séparation par ÉC trouvées dans la littérature sont elles aussi très variées. Parmi les méthodes en mode ÉCZ, on retrouve des séparations effectuées avec des tampons phosphates (pH 2 à 12)^{69.70}, carbonate et tétraborate de pH 8,5⁷⁸ avec comme additif de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 0,005 à 1 M)^{70.78} et du MeOH à 0,5 %⁷⁸. Pour le mode ÉCÉM, une étude relativement complète a été présentée par le groupe de Croubels⁶⁸. Des surfactants négatifs, cationiques et neutres ont été testés par ce groupe, soit le SDS, le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) et le Triton X-100 dans des tampons phosphates⁶⁸. La majorité des méthodes étudiées^{68.70.78} ont été maximisées. Par contre, un seul des trois composés d'intérêt (voir tableau V.I) y était séparé, soit la tétracycline (Tc)^{68.70.78}. La méthode de McGuffin⁶⁹ tentait de séparer tous les analytes sélectionnés mais une très faible résolution a été obtenue entre les divers analytes malgré une maximisation. La méthode d'identification des tétracyclinoïdes par CLHP de Santé Canada ne permettait pas de séparer avec une bonne sélectivité deux des trois analytes sélectionnés, soit la doxycycline (Doc) et la minocycline (Mnc). La mise au point d'une méthode de séparation efficace de ces standards pharmaceutiques par ÉC était donc justifiée.

5.2 Partie expérimentale

La méthode de séparation a été inspirée des conditions utilisées par Van Schepdael⁷⁸ et Cahours et coll⁵⁵. Le premier de ces groupes séparait la Tc de ses produits de dégradation en utilisant un tampon carbonate de pH 9,0 contenant 1 mM d'EDTA et 0,5 % de MeOH en appliquant un voltage de 12 kV sur un capillaire de 44 cm de long⁷⁸. Quant à la méthode de séparation des antiviraux utilisée par Cahours et coll.⁵⁵, elle a été présentée au chapitre 4.

Les paramètres qui ont été sélectionnés pour un capillaire de longueur standard étaient la composition du tampon (acétate, borate) ou de la solution électrolytique (acide formique/ammoniaque), son pH (4,0; 9,0 à 9,6; 10,0), sa force ionique (12 à 42 mM) ainsi

que l'addition de SDS (12,5 à 75,0 mM) et d'EDTA (0,5 à 1,5 mM). Le temps d'injection (1 à 4 s), la matrice (0 à 75 % ÉDF/eau) et le voltage (12,5 à 25,0 kV) ont aussi été étudiés.

5.3 Résultats et discussion

Pour réaliser cette séparation, plusieurs tampons ont été testés en solution libre. En utilisant un tampon acétate de pH 4 avec de l'EDTA comme additif, une séparation partielle des analytes chargés négativement a été obtenue. Le rôle de cet additif sur la séparation et les charges des analytes a été détaillé ultérieurement lors de la maximisation de ce paramètre. La séparation semblait être initialement possible en l'absence de surfactant. Un tampon borate a ensuite été testé à un pH de 9,4 avec et sans la présence de SDS. Un seul pic déformé correspondant aux trois analytes était visible dans les deux cas. En effet, un nombre très élevé de coudes (2 à 6) pouvait être observé sur ce pic (fig 5.3). Ce tampon a donc été éliminé mais ce pH alcalin a été conservé puisque le temps d'analyse requis était plus court de moitié par rapport aux essais à un pH de 4. Tel que mentionné précédemment, le groupe de Van Schepdael avait aussi obtenu de bons résultats approximativement au même pH mais dans un tampon carbonate⁷⁸. La solution électrolytique d'acide formique/ammoniaque utilisée pour séparer les antiviraux en mode ÉCÉM a ensuite été testée vu son bon fonctionnement dans le cas de la méthode précédente. Les premiers essais en mode ÉCÉM ont été concluants, c'est-à-dire qu'une séparation des trois tétracyclinoïdes était visible. Par la suite, un essai en solution libre a été tenté selon les conditions finales sélectionnées et une résolution inférieure a été obtenue entre la Doc et la Tc avec un ordre d'élution différent. En effet, cet ordre d'élution en mode ÉCÉM par rapport au mode ÉCZ était légèrement différent dans les mêmes conditions de base. L'ordre observé en ÉCÉM est Tc, Mnc suivi de la Doc tandis que celui en ÉCZ est Mnc, Tc, Doc. Dans le cas d'une séparation en mode ÉCÉM, les temps de migrations ne sont pas désavantageusement plus longs (environ 1 min de plus) pour une meilleure sélectivité ($R > 1,5$). Le surfactant n'a donc pas un effet très important sur la séparation puisque les analytes chargés négativement (groupements hydroxyles déprotonnés) sont peu affectés par les interactions hydrophobes/hydrophiles avec les micelles négatives. Les interactions sont toutefois suffisamment grandes pour inverser l'ordre d'élution entre la Tc et la Mnc. Il est donc possible que la Mnc en ÉCZ à un pH de

9,5 ait une charge partielle négative plus stabilisée dans le cycle phénolique D par rapport à la Tc à cause de la présence du groupe diméthylamino en R₁. En ÉCÉM, ceci rendrait la Mnc plus neutre par rapport à la Tc et elle interagirait donc davantage avec les micelles chargées négativement.

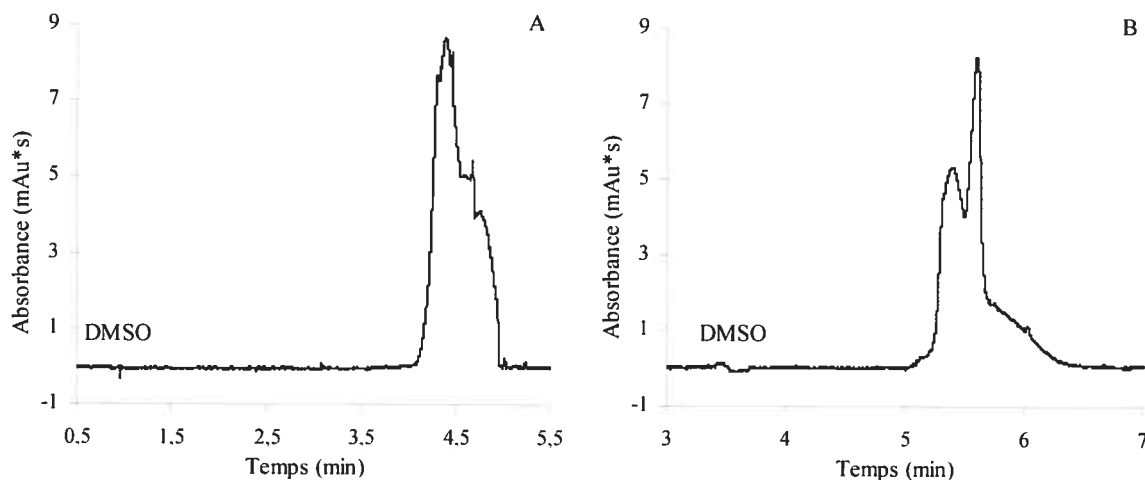


Figure 5.3 : Séparation des tétracyclinoïdes ($c = 0,50$ mM) par ÉCÉ et ÉCÉM. Tampon acide borique (pH 9,4; $I = 63$ mM); voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar). Section A : mode ÉCÉ et section B : mode ÉCÉM (SDS 50 mM).

Ayant fixé le point de départ de la méthode, une maximisation de ses paramètres a ensuite été effectuée afin d'influencer la séparation par ÉCÉM. L'effet du pH sur la séparation a été étudié et a démontré qu'il était peu influent pour la Doc et la Tc puisque leurs temps de migration restaient sensiblement les mêmes. Par contre, le temps de migration de la Mnc variait de manière significative dans ce domaine entraînant un changement dans l'ordre de migration. Le groupement amine supplémentaire dans la structure de la Mnc par rapport aux autres analytes (Tc et Doc) a pu être davantage influencé par des variations de pH. Une valeur de 9,5 a été choisie parce que la résolution était suffisamment grande pour un temps d'analyse légèrement plus court qu'à un pH de 9,0 telle qu'illustrée à la figure 5.4. De plus, l'efficacité des trois pics était grandement supérieure à ce pH surtout pour la Doc dont l'efficacité a augmentée d'un facteur de trois. Puisque cette solution d'analyse était volatile et qu'une différence de sélectivité importante était observée entre des valeurs de pH de 9,4 à 9,6, un contrôle rigoureux de ce paramètre a donc été nécessaire. La solution électrolytique a donc été préparée quotidiennement. L'effet de la force ionique sur la Doc a aussi été étudié. Cet effet était significatif parce que l'efficacité du pic augmentait avec la force ionique de manière quasi-linéaire. Par contre, le

choix de la force ionique a aussi été influencé par la grandeur des courants obtenus tel que pour le cas de l'analyse des antiviraux du chapitre 4. En effet, une force ionique de 50 ou 85 mM aurait pu être choisie afin d'obtenir une plus grande efficacité mais une valeur de 50 mM a été préférée parce que le courant y était inférieur (42 vs 69 μA). De plus, utiliser une force ionique plus faible présentait l'avantage de diminuer le temps d'analyse. Cela provient de son effet sur la double couche électrique des parois du capillaire. En effet, plus la force ionique est diminuée, plus la double couche électrique est épaisse et, donc, plus le FEO est grand (équation 1.3).

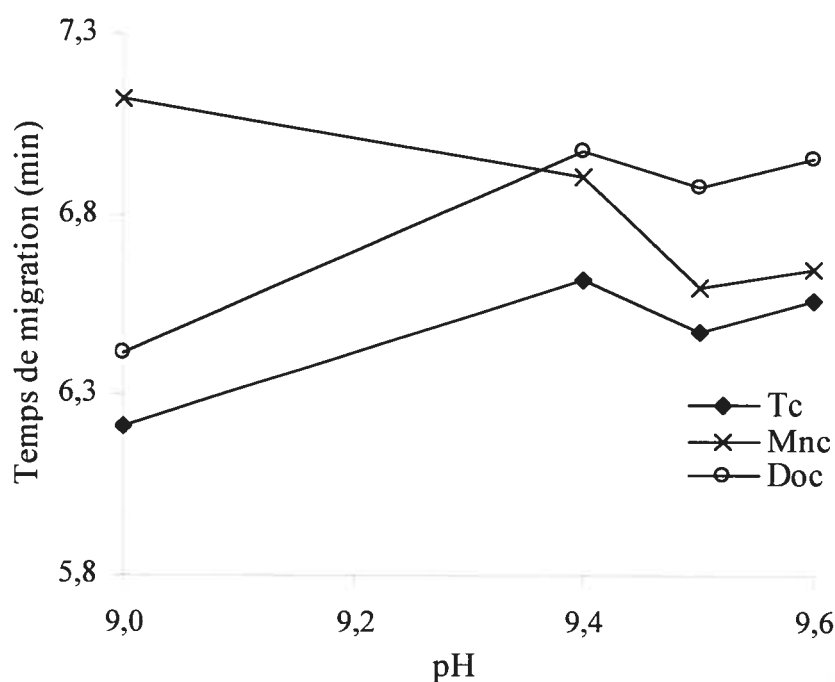


Figure 5.4 : Influence du pH de la solution électrolytique sur les temps de migration des tétracyclinoïdes. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque ($I = 25$ mM), SDS 25 mM; EDTA 1mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).

L'étude des effets du voltage sur la séparation a été effectuée pour les temps de migration et l'efficacité des trois analogues (fig 5.5). Telle que prévue, une augmentation du voltage a mené à une diminution des temps de migration des trois analogues et à une augmentation de l'efficacité du pic de la Tc. L'efficacité de la Mnc est cependant restée constante sur l'intervalle étudié tandis que celle de la Doc a diminué. Par contre, la fiabilité des valeurs d'efficacité pour la Mnc est moins grande, ce qui explique la petite variation pour une augmentation du voltage (voir éq. 1.7). Cela ne permet toutefois pas d'expliquer

le comportement de la Doc qui est d'autant plus surprenant étant donné que ce composé est un isomère de structure de la Tc. Quant à l'ordre d'élution, il est resté le même sur tout l'intervalle étudié. Finalement, un voltage de 15 kV a été conservé parce qu'il permettait d'obtenir une bonne résolution, une plus grande efficacité pour la Doc et un courant moins élevé. La variation du temps d'injection a aussi permis de conclure qu'un temps plus grand avait une influence négative sur l'efficacité plus faible de la Doc. Par ailleurs, lorsqu'un temps de 4 s était utilisé, une résolution inférieure à 1,5 était observée entre la Doc et la Mnc. Le temps d'injection a donc été maintenu à 2 s principalement parce que l'efficacité de la Doc était alors maximale pour un volume injecté de 3 nL.

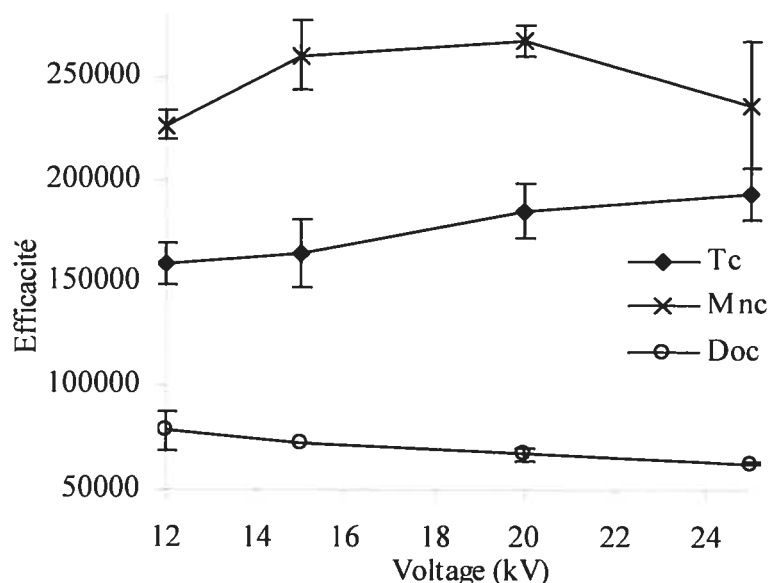


Figure 5.5 : Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des tétracyclinoïdes. pH 9,5; voir figure 5.4 pour les autres conditions expérimentales.

Plusieurs méthodes de séparation par CLHP et par ÉC de la littérature conseillaient l'utilisation de l'EDTA pour la séparation des tétracyclinoïdes^{70,78}. En ÉC, ils conseillaient son utilisation en l'absence de SDS. L'influence de cet additif a alors été étudiée sur l'efficacité de la Doc^{68,70-72,76,78-80}. L'EDTA est un ligand hexadenté qui complexe les cations métalliques¹⁸. Au pH de la séparation, le ligand devrait être majoritairement sous la forme d'un ion chargé négativement ($q = -3$) et le reste de l'additif, soit environ 20 %, devrait être complètement déprotonné ($q = -4$)¹⁸. Sa fonction lors de la séparation est controversée⁷¹. En effet, selon Hoogmartens⁷⁹ et Knox⁷¹, l'utilisation d'EDTA devrait aider à la séparation en capturant les impuretés inorganiques ioniques nuisibles pouvant

agir sur la surface de silanols. Par contre, selon Tsuchiya⁷⁶ et Zhang⁷⁰, sa présence pourrait mener à une compétition avec les tétracyclinoïdes pour la complexation des ions métalliques (ce qui peut aussi aider à leur solubilité). Un des autres rôles possibles est aussi l'apparition de paires d'ions entre l'EDTA et les tétracyclinoïdes. Si les charges partielles positives des tétracyclinoïdes sont suffisamment importantes à un pH de 9,5, la charge globale d'une paire d'ions sera négative. En laboratoire, il a été observé que l'absence de cet additif dans la solution d'analyse se traduit par des pics très difformes et mal résolus. D'après la maximisation, l'apparence des pics s'était effectivement déjà améliorée après l'ajout de 0,5 mM d'EDTA en présence de SDS. Selon les diverses concentrations testées en présence de 25 mM de SDS, une valeur de 1 mM en EDTA semblait la plus avantageuse au niveau de l'efficacité de la Doc qui est doublée par rapport à un essai effectué sans l'additif. Puisque la concentration de chacun des analytes était de 0,55 mM, il existait donc un rapport molaire de 2:3 entre les tétracyclinoïdes et l'EDTA.

La quantité de surfactant nécessaire dans la solution d'analyse a aussi été étudiée (fig. 5.6). Sa présence, en plus de celle de l'EDTA, semblait nécessaire afin de modifier la sélectivité de la méthode. En effet, la résolution entre la Doc et la Tc était insuffisante en absence de SDS et d'EDTA alors que la sélectivité globale était faible en la seule absence d'EDTA. On peut donc supposer que le SDS contribue à obtenir une meilleure sélectivité mais que sa présence n'est pas suffisante pour atteindre la valeur minimale désirée. La concentration en SDS aurait pu être fixée à 25 ou 50 mM en présence de 1 mM de EDTA puisque la résolution entre chacun des pics était suffisamment augmentée dans les deux cas. Par contre, une concentration en SDS de 25 mM a plutôt été choisie parce que les temps d'analyse étaient alors légèrement plus courts pour une résolution suffisante ($R = 2,3$) grâce à une diminution de la force ionique de la solution électrolytique. De plus, l'efficacité la plus faible de la Doc était plus grande de 10 000 pour cette même concentration. L'influence de l'ajout du surfactant sur le courant était relativement faible puisque ce dernier augmentait de seulement 11 μA sur l'intervalle étudié.

L'importance de la matrice des standards et du préconditionnement ont aussi été des paramètres analysés lors de la maximisation. L'intervalle choisi pour vérifier les effets de la matrice était situé entre 0 à 75 % de la solution électrolytique dans l'eau. Ces effets se sont montrés peu influant sur l'efficacité de la Doc puisque le coefficient de variation entre

toutes les mesures confondues était de 3,4 %. Par contre, selon le modèle choisi, les solutions des tétracyclinoïdes devaient être conservées à la noirceur et au froid puisque leurs couleurs changeaient dans le temps (en quelques heures). Cet inconvénient n'était pas prévu parce que seule la chlortétracycline devait être instable dans des conditions alcalines^{72,73}. Tels qu'attendus, les tests sur le préconditionnement ont quant à eux démontrés une plus faible performance pour un conditionnement du type ÉCZ plutôt que celui spécialement conçu pour le mode ÉCÉM (sans NaOH). Expérimentalement, ceci était visible par la variation des temps de migration des pics jusqu'à la coélution de la Mnc et de la Doc pour un conditionnement du type ÉCZ.

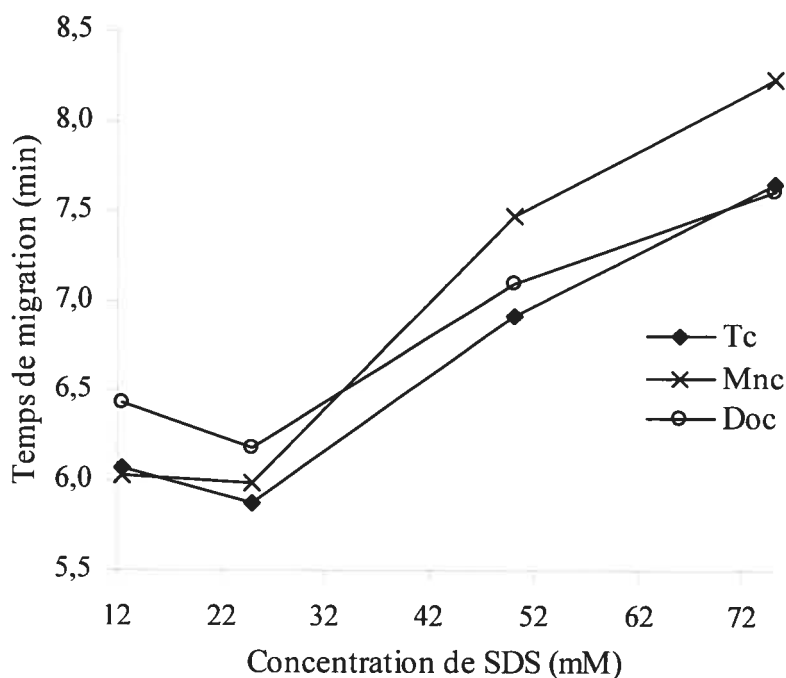


Figure 5.6 : Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des tétracyclinoïdes. pH 9,5; voir figure 5.4 pour les autres conditions expérimentales.

Les conditions de séparation fixées sont disponibles au tableau V.II. Après maximisation, il est possible de constater qu'en général, les paramètres choisis pour effectuer la séparation des tétracyclinoïdes sont similaires à ceux qui ont été présentés aux chapitres précédents. La séparation a été effectuée à 260 nm puisque, selon les spectres UV, deux des analytes y présentaient une absorption plus élevée quoiqu'une valeur de 370 nm aurait aussi pu être choisie.

Tableau V.II : Conditions de séparation des tétracyclinoïdes.

Préconditionnement :	4 min solution électrolytique ; 2 min d'attente ; 4 min solution électrolytique		
Injection :	2 s à 50 mbar (3 nL)		
V / T / λ :	15 kV	25 °C	260 nm
Solution électrolytique :	HCOOH (50 mM) / NH ₄ OH (72 mM) pH 9,5 ; I = 25 mM ; SDS (25 mM) ; EDTA (1 mM)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,55 mM	50 % EDF/eau	5 % DMSO

La figure 5.7 constitue un exemple d'électrophérogramme obtenu pour cette séparation. Par son apparence générale, il peut en être conclu que la séparation est rapide et la résolution suffisante mais que l'efficacité de la Doc est plus faible. En effet, ce pic possède un important facteur d'asymétrie de 2, ce qui est insatisfaisant. On constate également que de petits pics sont visibles autour des trois tétracyclinoïdes. En effet, la Tc et certains de ses analogues peuvent se dégrader selon plusieurs processus : par déshydratation, par épimérisation et par épimérisation-déshydratation^{76,78}. Ce point est d'autant plus intéressant que certaines de ces impuretés ne sont pas actives mais surtout que d'autres sont toxiques et réglementées telles que l'anhydrotétracycline et la 4-épianhydrotétracycline, deux produits de dégradation par fermentation dont la réaction est illustrée à la figure 5.8^{69,78}.

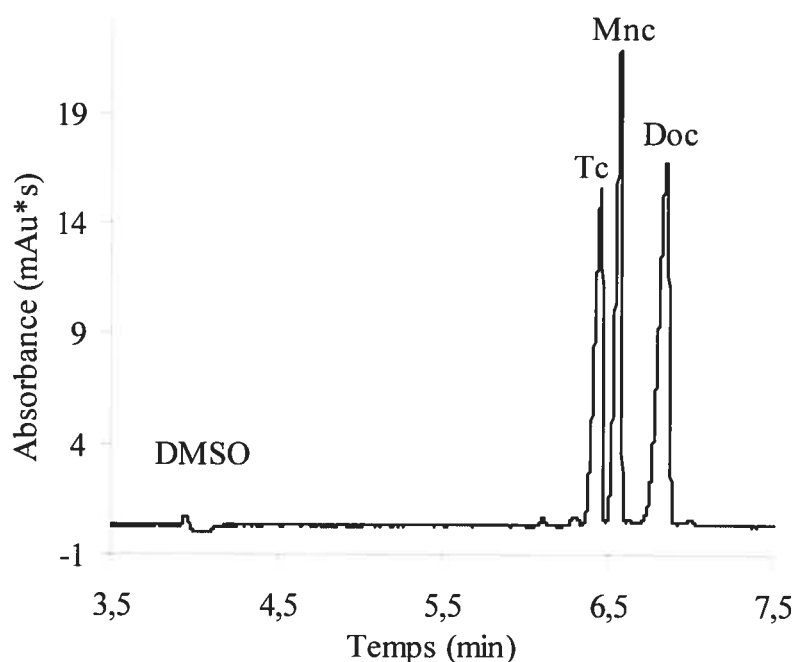


Figure 5.7 : Séparation des tétracyclinoïdes (c = 0,55 mM) par ÉCÉM. Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (pH 9,5; I = 25 mM), SDS 25 mM; EDTA 1 mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).

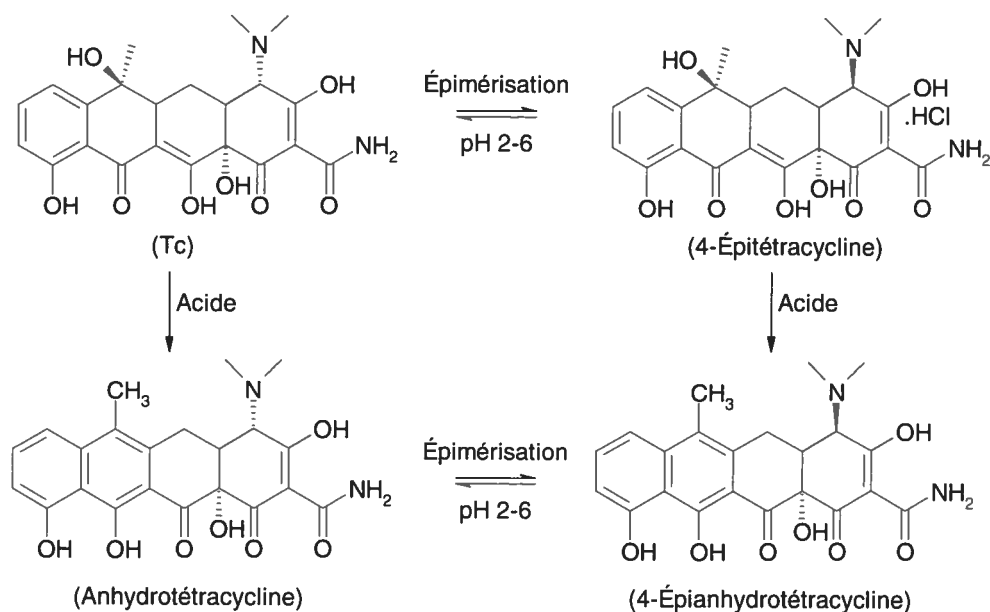


Figure 5.8 : Réaction de décomposition de la tétracycline par épimérisation-déshydratation^{76,78}.

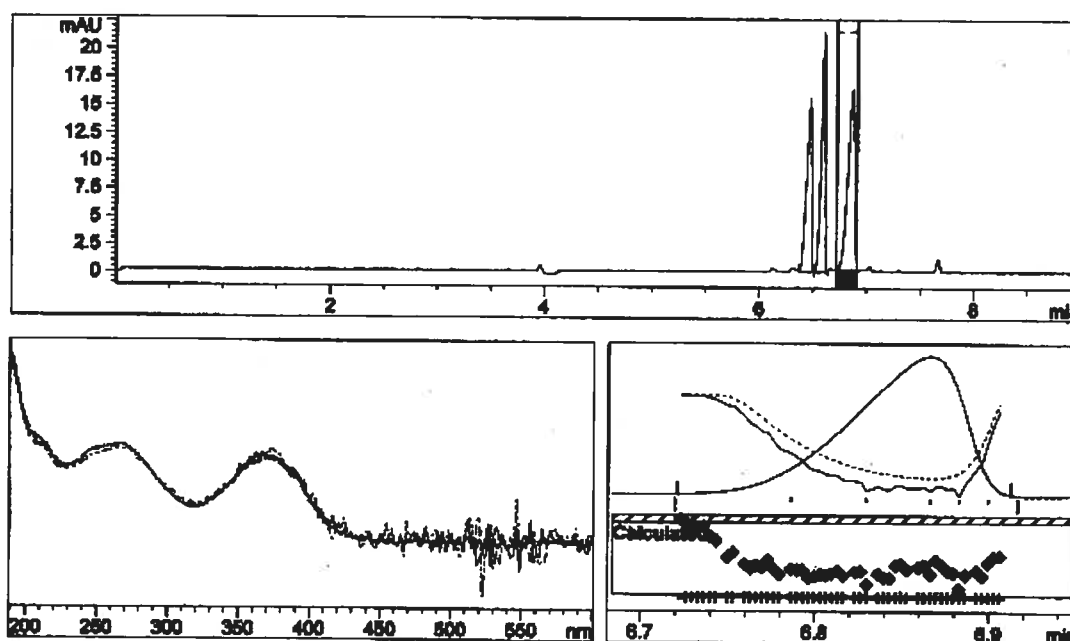
Les paramètres analytiques de la méthode ont été déterminés selon la méthode standard (voir tableau V.III). Les reproductibilités des résultats pour le temps de migration et la mobilité apparente ainsi que celle de l'aire sont très bonnes puisqu'elles sont respectivement de 0,1 à 0,3 % et de 0,6 à 1,2 % pour les trois pics. La plus faible des résolutions obtenues est suffisante mais l'efficacité de la Doc est très faible selon les valeurs normales attendues en plus de posséder un facteur d'asymétrie important. La nature de la solution d'analyse utilisée ou la présence d'impuretés coéluantes pourrait en être la cause. Pourtant, l'analyse de la pureté du pic à l'aide du logiciel Chemstation de Agilent montre que ce pic est d'une pureté suffisante puisque son facteur de pureté moyen est de 840 sur 1000, ce qui est acceptable selon les normes de l'instrument. Il est effectivement possible de voir le rapport émis par l'instrument pour le facteur de pureté de ce pic à la figure 5.9. Ce rapport est calculé à partir des absorbances des spectres UV sélectionnés dans le pic par l'instrument. Sur la partie gauche de cette figure, on peut constater la ressemblance entre les 49 différents spectres UV du pic de la Doc. Quant à la section de droite, elle contient deux traits superposés sur le pic : la courbe de similarité et la courbe du bruit représentée en pointillée. Ces deux courbes aident à déterminer s'il y a présence d'impuretés sous le pic. Elles devraient toutes deux être droite au centre et symétrique de chaque côtés. Si la courbe du pointillée bruit va sous celle de la similarité, ce bruit est considéré comme étant une impureté. Dans le cas présent, cette courbe semble être

acceptable. Les LD sont dans le domaine attendu et les courbes de sensibilité possèdent un coefficient de linéarité allant de 0,999 à 1,000 pour des concentrations entre 0,06 et 0,60 mM, ce qui est très bon.

Tableau V.III : Résultats analytiques pour la séparation des tétracyclinoïdes^a.

Composé	t_m (min)	u_{app} (10^{-4} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
Tc	6,47(1) ^d	3,33(1)	49,7(3)	-	0,79(4)	3,1(7)	10(2)
Mnc	6,60(2)	3,27(1)	53,2(6)	1,55(8)	1,38(7)	2,4(5)	8(2)
Doc	6,865(9)	3,14(4)	73,6(7)	2,7(2)	0,49(6)	3,5(8)	12(3)

^a $N = 3$; ^b $LD = 3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c $LQ = 10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d (s) : 4,79(1) = 6,47 \pm 0,01



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 839.600 (48 of 49 spectra are within the calculated threshold limit.)

Figure 5.9 : Analyse de la pureté du pic de la Doc ($c = 0,55$ mM). Solution électrolytique acide formique/ammoniaque (pH 9,5; $I = 25$ mM), SDS 25 mM; EDTA 1 mM; voltage 15 kV; injection 2 s (50 mbar).

Puisque la méthode de séparation a été inspirée de deux méthodes disponibles dans la littérature, dont une relative à une autre série d'analogues, les résultats seront comparés à ceux obtenus par le groupe de Van Schepdael pour leur méthode appliquée à l'une des trois tétracyclinoïdes seulement⁷⁸. Elle leur avait permis d'obtenir une analyse de 10 min pour la Tc avec une reproductibilité de 2,5 % pour le temps de migration et de 1,0 % pour l'aire. Leur sensibilité était d'un coefficient de corrélation de 0,998 et leur LD de 1 μM pour la

Tc. La qualité des résultats expérimentaux présentés dans le cadre de ce chapitre semble donc être équivalente pour cet analyte.

5.4 Conclusion

La méthode développée pour la séparation des tétracyclinoïdes par ÉC s'est avérée être rapide, reproductible, suffisamment sélective et compétitive en comparaison à la séparation peu sélective présentée par McGuffin pour les trois mêmes analytes⁶⁹. Elle est aussi définitivement supérieure à la méthode d'identification par CLHP de Santé Canada pour laquelle on observe la coélution de la Doc et de la Mnc. Il aurait été intéressant d'identifier les pics de dégradation observés lors de la séparation puisque certaines de ces impuretés pourraient être potentiellement toxiques et réglementées. En effet, une étude du vieillissement de ces médicaments en fonction du temps et de la température pourrait être menée afin de vérifier l'impact de l'entreposage domestique sur cette famille de composés. Une étude plus approfondie des effets théoriques et expérimentaux de l'EDTA aurait aussi été intéressante.

6. SÉPARATION DE PÉNICILLINES

6.1 Introduction

Les antibiotiques du type β -lactames sont utilisés dans le traitement des infections bactériennes à Gram positif et négatif⁸¹. Cette série d'analogues est donc le deuxième type d'antibiotiques à avoir été analysé à l'aide de l'ÉC dans le cadre de ce projet. Ce sont d'importants antibiotiques puisqu'ils ont été du type le plus prescrit au Canada pour la période d'avril 2000 à mars 2001 selon le PICRA, soit deux fois plus que les tétracyclinoïdes⁶⁷ (chapitre 5). Les pénicillines sont surtout utilisées pour le traitement des infections relatives au système respiratoire^{67,82}. Elles servent aussi au traitement des animaux propres à la consommation tels que les ruminants^{81,83}. Leur utilisation est réglementée puisque certains microorganismes développent de la résistance à ces antibiotiques^{84,85}. Par ailleurs, certains auteurs estiment que le développement d'allergies à ces médicaments pourrait être causé par la présence de produits de dégradation^{84,85}.

D'après la figure 6.1, il est possible de constater que les structures de base de ces composés sont semblables. Il est aussi possible de noter que la structure de la pivampicilline (Pivamp) découle de celle de l'ampicilline (Ampi). En effet, la Pivamp a été la première pro-drogue de l'Ampi à avoir été utilisée afin de faciliter son absorption orale⁸⁶. La structure de base de ces pénicillines est constituée d'un cycle thiazolidine attaché à un cycle β -lactame (azetidinone) comprenant une chaîne latérale avec un cycle aromatique⁸². Les maxima d'absorption de ces molécules sont donc similaires entre eux et sont disponibles dans le tableau VI.I. Selon le groupe de Li⁷⁵, l'amoxycilline (Amoxy), l'Ampi et la pénicilline G (Pn G) absorberaient aussi entre 198 et 200 nm et elles seraient négativement chargées à un pH situé entre 6 et 8. Par contre, le pK_a d'une seule pénicilline a été trouvé dans la littérature⁷⁵.

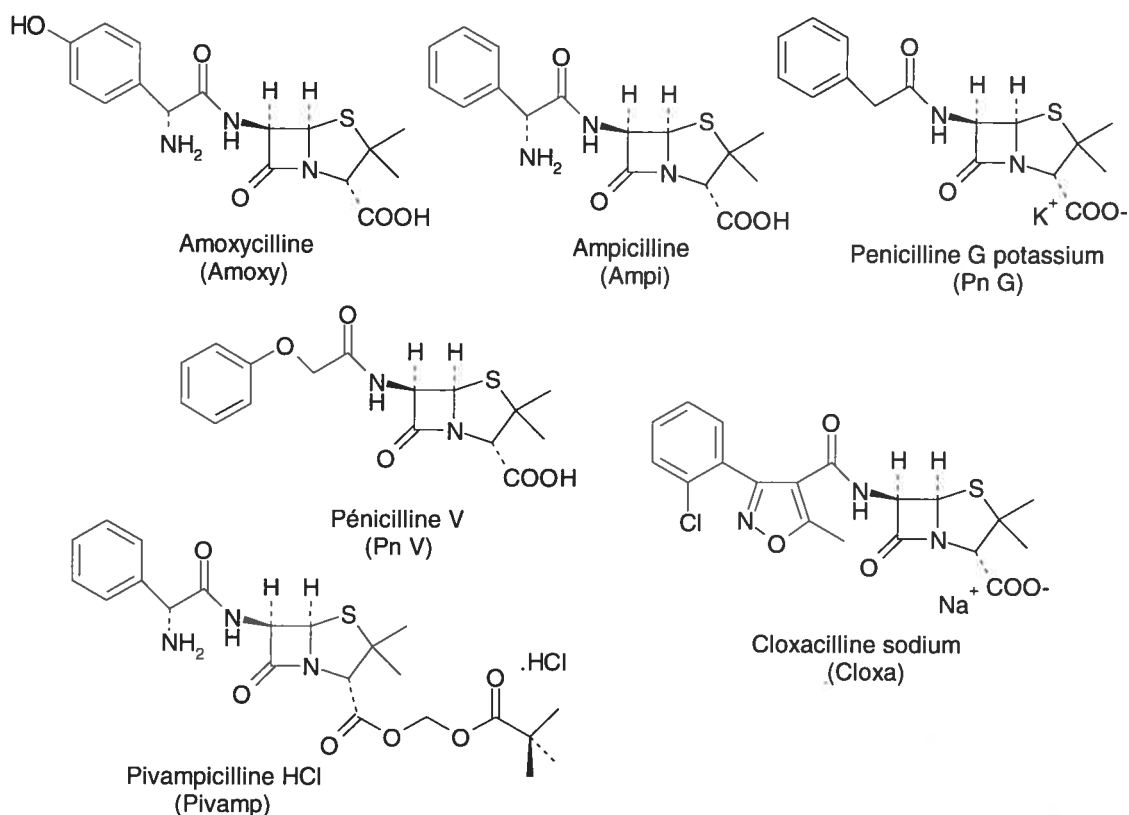


Figure 6.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation des pénicillines étudiées.

Tableau VI.I : Propriétés physico-chimiques des pénicillines⁵⁰.

Composé	MM (g/mol)	λ_{\max} (nm)	pK _a	Solubilité à T _{AMB}
Amoxy	365,41	230, 274 (EtOH) 229, 272 (1 N HCl) 248, 291 (1 N KOH)	-	4,0 mg/mL dans l'eau et 7,5 mg/mL dans l'EtOH.
Ampi	349,41	-	-	~ soluble dans l'eau.
Pivamp	500,02	256, 262, 268	~ 7	Soluble dans l'eau.
Pn G	372,49	252, 257, 264	-	Soluble dans l'eau.
Pn V	350,39	268, 274	-	Soluble dans l'eau (pH 1,8) et les solvants polaires.
Cloxa	475,88	-	-	Soluble dans l'eau, le MeOH et l'EtOH.

Un grand nombre de méthodes de séparation des pénicillines par CLHP sont disponibles^{81,82,84,86-93}. Ces méthodes offrent une grande diversité puisque certaines sont utilisées pour séparer les pénicillines de leurs produits de dégradation tandis que d'autres sont utilisées pour séparer les pénicillines entre elles ou encore d'avec plusieurs autres types d'antibiotiques. Les méthodes connues semblent offrir une bonne performance

analytique pour des temps d'analyse allant de 8 à 26 min. Les méthodes utilisées en ÉC présentaient généralement des temps d'analyse d'entre 11 et 17 min^{75.83.94.95}. Les méthodes effectuées avec un détecteur UV/visible fixé entre 198 et 220 nm utilisaient un tampon phosphate-borate de pH 7 à 9^{75.94.95} ou un tampon tétraborate de pH 8,5 à 10,5⁸³. Les additifs utilisés étaient le pentasulfonate de sodium, le *N*-lauryl-*N*-méthyltaurate de sodium (LTM)⁹⁴, le SDS⁹⁵ et l'EDTA⁸³. Le voltage de séparation sur des capillaires de 50 à 65 cm était de 15 à 20 kV^{75.83.94.95}. Un point important à mentionner est qu'aucune des méthodes maximisées utilisant le même détecteur ne séparait plus de quatre des six pénicillines sélectionnées par Santé Canada^{75.83.94.95}. La séparation des six pénicillines semblait donc être une amélioration potentiellement intéressante pour Santé Canada.

6.2 Partie expérimentale

Puisque toutes les méthodes de séparation trouvées dans la littérature^{75.83.94.95} étaient très similaires, ces méthodes ont initialement été testées afin de déterminer leur efficacité. Un grand nombre de paramètres a été étudié afin de régler les difficultés rencontrées expérimentalement. Des tampons borate, phosphate et acide formique/ammoniaque ont été utilisés avec une gamme de pH étendue (2,0; 6,0 à 7,8; 8,5 et 9). La force ionique a été étudiée entre 24,0 et 77,0 mM et divers additifs ont été ajoutés tels que le CTAB, l'EDTA, le SDS et le phosphate de tétrabutylammonium (TBAP) qui est un agent de pairage ionique. Les structures du CTAB et du TBAP sont disponibles à la figure suivante. Le voltage a été varié entre 12,0 et 25,0 kV, le temps d'injection entre 1 et 4 s à 50 mbar et les modes de préconditionnement de ÉCZ et ÉCÉM ont été effectués. Un très grand nombre d'essais sur la matrice a aussi été effectué.

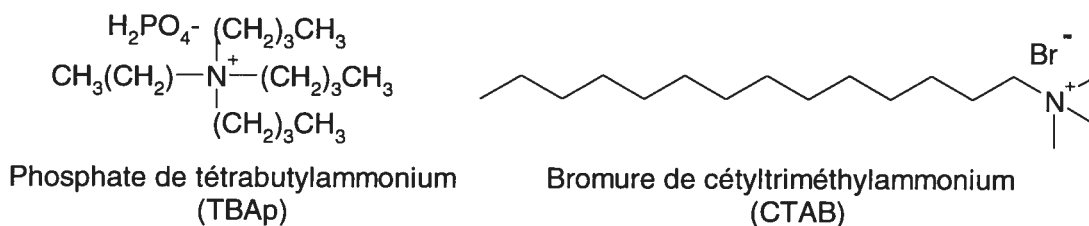


Figure 6.2 : Structure moléculaire, nom et abréviation du CTAB et du TBAP.

Les solutions utilisées pour ce projet étaient préparées quotidiennement et conservées au réfrigérateur entre les utilisations. Finalement, le principe d'état d'équilibre qu'atteint le capillaire avec le temps développé par Smith et *coll.*²³ était dans ce cas-ci extrêmement long (une journée) puisqu'effectivement, l'additif est un agent de pairage ionique. Afin de réduire le temps d'attente pour ce conditionnement, il serait plus efficace de conserver un capillaire pré-équilibré prêt à être utilisé.

6.3 Résultats et discussion

Puisque les méthodes présentées dans la littérature utilisaient toutes un tampon phosphate et/ou borate de sodium, ils ont été testés en premier en mode ÉCÉM à un pH de 8,5. Le choix initial d'analyse par mode ÉCÉM est justifié pour plusieurs raisons. Selon certains auteurs^{94,95}, l'utilisation de ce mode pour certaines molécules ioniques pourrait influencer avantageusement la sélectivité et l'apparence générale des pics par rapport à une séparation en mode ÉCZ. Selon eux, l'usage de SDS semble être avantageux puisqu'il permettrait d'éliminer la coélution entre l'Ampi et l'Amoxy. Lorsqu'un tampon borate était utilisé en présence de SDS, une addition de 15 % de MeOH était nécessaire afin d'augmenter la solubilité du surfactant dans ce tampon. Cette combinaison semblait peu utile à plus long terme puisque le SDS précipitait en cours de séquence par l'évaporation du MeOH dans le temps.

Le tampon phosphate utilisé pour le premier essai a permis d'obtenir un meilleur résultat par rapport au tampon borate. Par la plus grande solubilité du SDS dans ce tampon, une meilleure résolution entre les pics était obtenue. En effet, cinq des six pics attendus étaient visibles avec une résolution supérieure à 1,5 à l'aide du tampon phosphate. Par contre, les six pics n'ont pas été observés en variant des paramètres tels que le pH, l'ajout d'EDTA ou la variation de la quantité de surfactant. D'après ces résultats, il semblait tout de même préférable de maintenir une concentration d'au moins 75 mM en SDS dans le tampon phosphate de pH 7,5 afin de maintenir une meilleure sélectivité pour la séparation des pics présents. Un autre phénomène important à avoir été observé est la faible reproductibilité des temps de migration. En effet, les coefficients de variation étaient entre 3,9 et 6,5 % pour les cinq pics. La méthode utilisée pour les tétracyclinoïdes (chapitre 5) a

alors été tentée car elle aurait pu permettre la séparation simultanée de tous les antibiotiques étudiés dans le cadre de ce projet. Par contre, la qualité de la séparation s'en est trouvée diminuée pour les modes ÉCZ et ÉCÉM.

Le tampon phosphate a donc été utilisé afin de réaliser des expériences supplémentaires. La faible reproductibilité provenait peut-être de la matrice dans laquelle les pénicillines ont été dissoutes. En effet, cette solution constituée de 50 % ÉDF/eau semblait parfois être trouble. Deux matrices ont alors été utilisées : une première d'eau et une seconde d'ÉDF et de SDS à 37,5 mM. Cette seconde matrice a été testée parce que selon certains auteurs^{94,95} la présence de SDS devait aider à diminuer ou éliminer la coélution entre l'Ampi et l'Amoxy. Mettre les analytes en présence de micelles avant même la séparation dans le capillaire pouvait possiblement augmenter leur stabilité. Une matrice constituée de tampon phosphate et de SDS à 37,5 mM s'est avérée être plus efficace que celle d'eau puisque la séparation de cinq des six pics y était meilleure. Par contre, les problèmes de solubilité y étaient plus prononcés que dans l'eau. De plus, l'injection individuelle des pénicillines ne permettait pas leur identification parce que lorsqu'elles étaient combinées, les temps de migrations n'étaient pas les mêmes que lorsqu'elles étaient injectées individuellement.

En effet, l'addition ou la soustraction totale d'un de ces analytes semblait modifier le milieu de séparation possiblement due à des interactions entre les analytes eux-mêmes. Ce problème a aussi été rencontré lors de l'ensemencement de la solution, c'est-à-dire l'addition d'une quantité supplémentaire d'un des analytes dans la solution. La solution proposée aux variations des temps de migrations était d'éliminer un maximum possible d'interactions entre additifs et analytes pendant la séparation. La solution envisagée était donc de diminuer le nombre d'additifs présents dans le tampon. Des essais en mode ÉCZ ont été effectués afin de vérifier cette hypothèse. Une séparation à pH 2,0 des six analytes permettait d'observer qu'un seul pic pour une analyse de 20 min. De plus, seulement cinq des six analytes pouvaient être séparés en 15 min à pH neutre. Puisqu'aucune séparation complète des six analytes n'a été obtenue en mode ÉCZ ou avec un tampon contenant un surfactant anionique, l'utilisation de deux surfactants cationiques a été étudiée.

Le premier additif cationique à avoir été testé est le TBAP qui agit plutôt comme un agent de pairage ionique grâce à son interaction avec la fonction carboxylique des pénicillines. Sa présence améliore généralement la symétrie (*tailling*) des pics⁹⁶. Plusieurs auteurs ont utilisés cet additif afin de réaliser la séparation d'une pénicilline et ses produits de dégradations par HPLC avec de bons résultats^{82,87,88}. Par contre, il ne devrait pas se trouver sous forme de micelles dans le tampon, même à de hautes concentrations, à cause de sa petite taille et de sa structure étoilée⁹⁷. Les six analytes ont ainsi été aisément séparés à l'aide du TBAP. La matrice de la solution de standards était alors de 10 % MeOH/eau puisqu'elle permettait d'obtenir une meilleure solubilité pour la Pivamp. Le temps d'analyse nécessaire était toutefois trois fois plus long que lors des essais précédents (29 min). Une très faible reproductibilité du temps de migration de 1,4 à 8,9 % de coefficient de variation a alors été trouvée dépendamment des analytes pour un tampon phosphate de pH 6,5 avec une concentration de 60 mM en TBAP. La reproductibilité était meilleure ou équivalente (1,4 à 6,6 %) pour les quatre premiers analytes à migrer alors que celle des deux derniers analytes, soit le Pn G et le Pn V, était équivalente ou pire (8,5 à 8,9 %) aux meilleurs conditions trouvées avec le SDS. Tel que mentionné plus haut, la reproductibilité avec le SDS dans une matrice similaire était de 3,9 à 6,5 % et seulement cinq des six pics attendus étaient visibles.

Tel qu'aussi observé en mode ÉCÉ, l'addition de TBAP fait migrer la Pivamp avant le FÉO (fig 6.3). La fenêtre de migration devrait normalement être comprise entre le FÉO et les micelles lorsqu'un surfactant est employé^{7,9}. Par exemple, dans le cas d'un surfactant cationique utilisé avec un voltage négatif, les petites molécules neutres et hydrophiles qui marquent le flux telles que le MeOH ou le DMSO seront les premières à migrer. Ces molécules ne devraient pas interagir avec les micelles puisqu'elles ne participent pas à un mécanisme de partition avec celles-ci. Dans la fenêtre de migration, les analytes devraient être attirés ou repoussés par les micelles selon leur charge et leur hydrophilicité. Le dernier pic de l'électrophérogramme devrait correspondre au marqueur de micelles puisqu'il serait totalement incorporé dans ces volumineuses agglomérations chargées positivement dont la mobilité électrophorétique est dirigée en sens opposé à celle du FÉO.

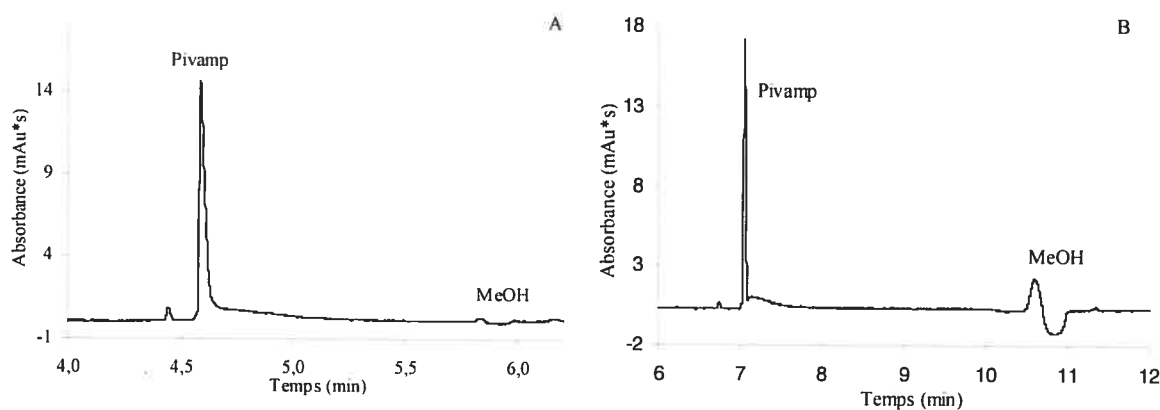


Figure 6.3 : Séparation de la Pivamp ($c = 0,125$ mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,4; $I = 47$ mM); voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar). Section A : mode ÉCÉ et section B : mode ÉCÉ (TBAP 60 mM).

Une hypothèse qui pourrait expliquer la migration de la Pivamp en dehors de cette fenêtre est que, dans le cas d'un agent de pairage ionique, le mécanisme micellaire⁹⁷ demeure inactif et l'analyte cationique n'interagit alors que peu ou pas avec l'agent de pairage cationique. La Pivamp migrerait alors tel qu'elle le ferait en l'absence de TBAP, soit avant le FÉO. La migration des autres analytes pourrait être expliquée selon leur rapport de charge sur masse molaire à l'exception près que l'agent de pairage ionique fait varier ce rapport. Selon les essais effectués au pH d'analyse sans additif, l'Amoxy aurait une charge partielle négative très faible, l'Ampi, la cloxacilline (Cloxa), la pénicilline V (Pn V) et la Pn G seraient chargées négativement alors que la Pivamp serait cationique. Le pic suivant la Pivamp et le FÉO est celui de l'Amoxy dont la charge globale serait presque nulle vue la très faible différence de temps de migration entre le pic correspondant et le FÉO. L'Amoxy est ensuite suivie de l'Ampi puis des trois autres pénicillines dont la charge anionique serait plus grande.

Pour cette séparation, l'identification des analytes s'est avérée être complexe à effectuer à cause de changements des temps de migration selon le nombre de pénicillines présentes. Par exemple, l'ajout de la Cloxa à la solution standard ne semblait pas avoir d'influence sur la migration de la Pivamp contrairement à l'ajout de l'Ampi, de la Pn G ou V. Par ailleurs, l'ajout de la Pn V avait une influence certaine sur migration de la Pn G et de la Cloxa. Ces essais semblent montrer qu'il existe des interactions importantes entre les analytes puisque l'ajout ou le retrait de l'un d'entre eux affecte la migration des autres en présence de TBAP. Ce phénomène avait aussi été observé en présence de SDS. Par la figure 6.4, ces

déplacements de pics peuvent être observés. Il faut aussi noter que le voltage utilisé avec le TBAP est positif et non négatif. La présence de TBAP ne semble pas causer l'inversion du FÉO normalement observée avec l'ajout de longues chaînes de sels de tétraalkylammonium⁴ puisque tous les analytes ont ainsi pu être détectés avec un voltage positif. Cette absence d'effet sur le FÉO est probablement due à la petite taille de l'additif. Un voltage négatif aurait peut-être aussi pu résulter en une analyse convenable.

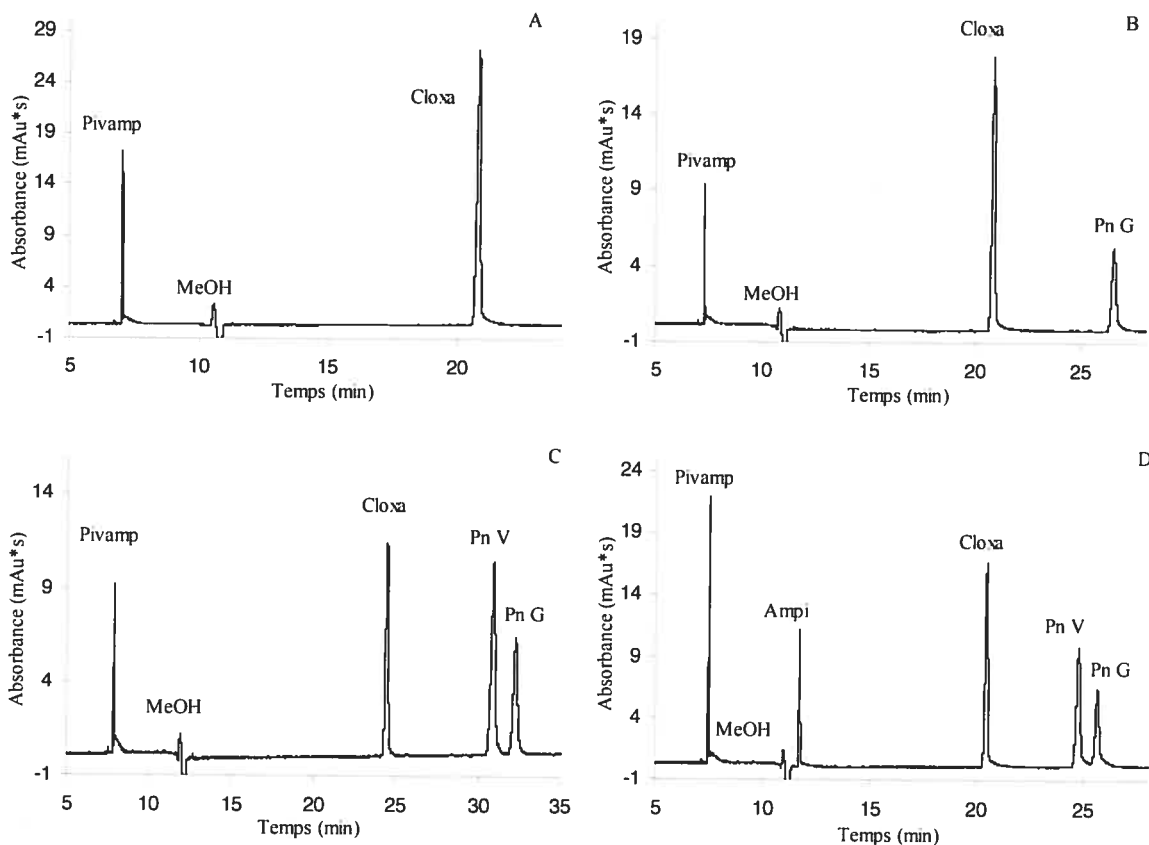


Figure 6.4 : Étude des variations des temps de migration par l'injection de solutions de pénicillines ($c = 0,13$ à $0,30$ mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,5; $I = 47$ mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar). Section A : deux analytes en solution. Section B, C, et D : respectivement trois, quatre et cinq analytes en solution.

L'identification des pénicillines a donc été effectuée en injectant une solution contenant simultanément tous les analytes à des concentrations très différentes. Telle qu'illustrée à la figure 6.5, la méthode d'identification par différence de concentration permet de différencier la Pn G de la Pn V ainsi que l'Ampi de l'Amoxy. La Cloxa et la Pivamp se trouvaient maintenant dans des régions isolées de l'électrophérogramme. La distinction

entre les analytes problématiques devenait donc plus facile par l'utilisation de différences de concentration d'un facteur de sept.

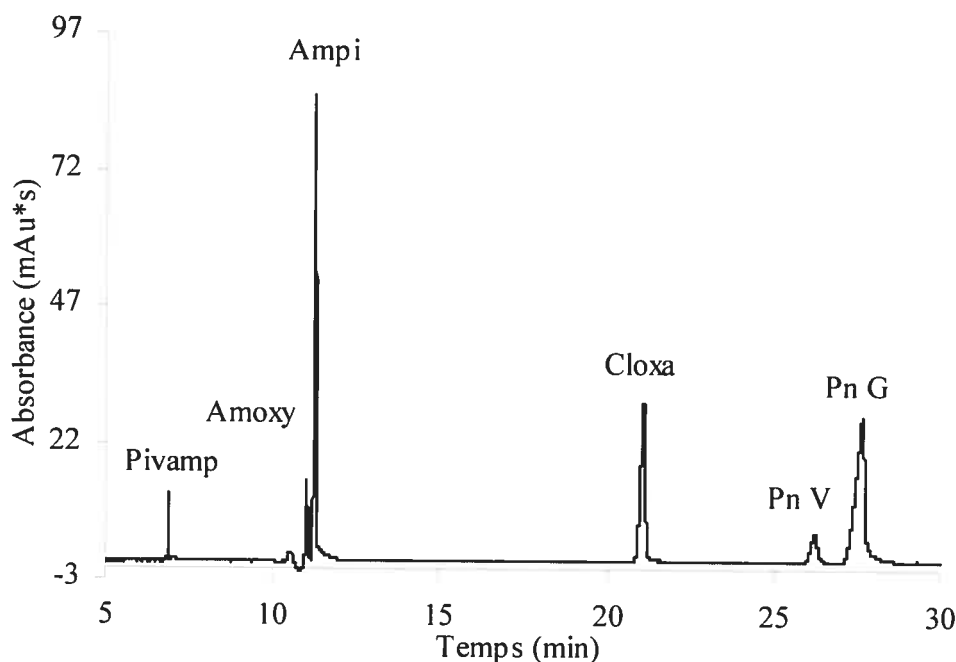


Figure 6.5 : Identification des pénicillines ($c = 0,17$ à $1,24$ mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,5; $I = 47$ mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).

D'autres essais ont également été effectués avec un surfactant cationique en suivant une méthode semblable, soit le CTAB. La sélectivité était alors moins bonne et la ligne de base moins stable mais le temps d'analyse ainsi que la reproductibilité étaient meilleurs ($CV = 0,008$ à $1,460$ %). Cette nouvelle méthode a été écartée en raison de la sélectivité et de la sensibilité inférieure. Il aurait peut-être été pertinent de combiner le TBAP avec le CTAB. En effet, cinq des six analytes sont neutres à l'aide du TBAP et le CTAB aurait peut-être permis de les séparer avec une bonne sélectivité.

La maximisation de la méthode de séparation des pénicillines avec le TBAP utilisant la méthode d'identification a été effectuée pour plusieurs paramètres dont le pH et la force ionique du tampon phosphate. Pour la maximisation de ces analytes, il est important de rappeler que les barres d'erreurs des graphiques des temps de migration sont exceptionnellement représentées puisqu'elles sont supérieures à $1,1$ %. La maximisation du pH (voir figure 6.6) a démontré une perte de sélectivité entre l'Amoxy et l'Ampi

lorsqu'il était diminué en dessous de 6,5. Le pH de choix semblait donc se situer entre 6,5 et 7,0. Un pH de 7,0 aurait été plus avantageux en ce qui concerne le temps de migration du dernier analyte qui se voyait réduit de 30 à 12 min avec une reproductibilité grandement supérieure lors de la maximisation. Par contre, puisque la reproductibilité des trois derniers analytes était très variable à plus long terme, un pH de 6,5 a plutôt été sélectionné. Ce choix a été fait afin de garantir l'identité de chacun des deux pics en augmentant au maximum possible l'écart entre leurs temps de migration. Quant à la maximisation de la force ionique (voir figure 6.7), la sélection d'une valeur de 47 mM a aussi été faite en fonction d'obtenir une meilleure sélectivité entre la Pn V et la Pn G au détriment de l'efficacité de certains analytes.

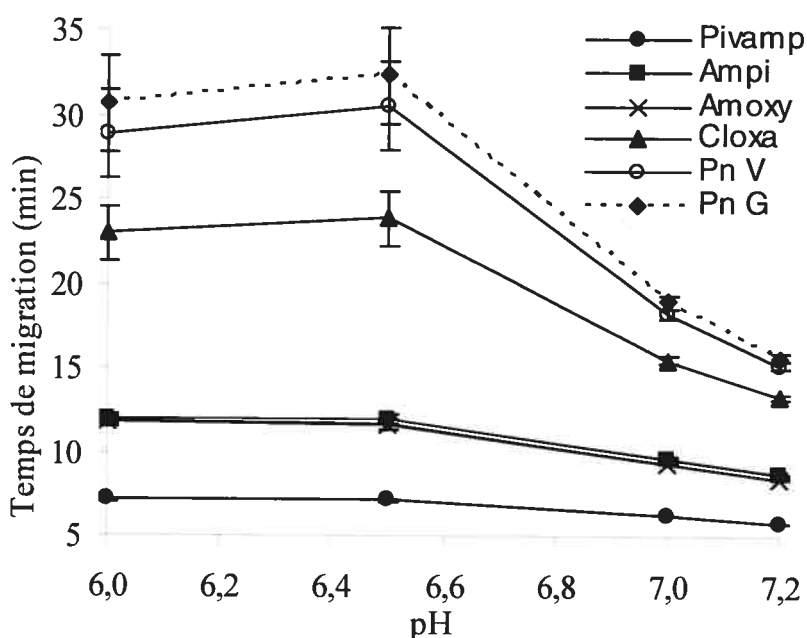


Figure 6.6 : Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des pénicillines. Tampon phosphate, TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).

Les effets du voltage, de la concentration en TBAP et du temps d'injection (voir tableau VI.II) ont aussi été étudiés pour cette séparation mais n'ont pas semblé avoir un effet global marqué sur les efficacités ou les temps de migration. Un voltage de 15 kV a été choisi parce qu'après plusieurs essais, il semblait être mieux adapté aux variations des temps de migration malgré une efficacité légèrement plus faible et un temps d'analyse plus long de 10 min. Un temps d'injection de 3 s (5 nL) et une concentration de 60 mM en TBAP ont

aussi été sélectionnés en raison de leur impact sur le bruit de fond et sur la sélectivité de la méthode respectivement. Quant au mode de préconditionnement (voir tableau VI.II), il a été choisi en fonction de son impact sur la reproductibilité et la solubilité des analytes.

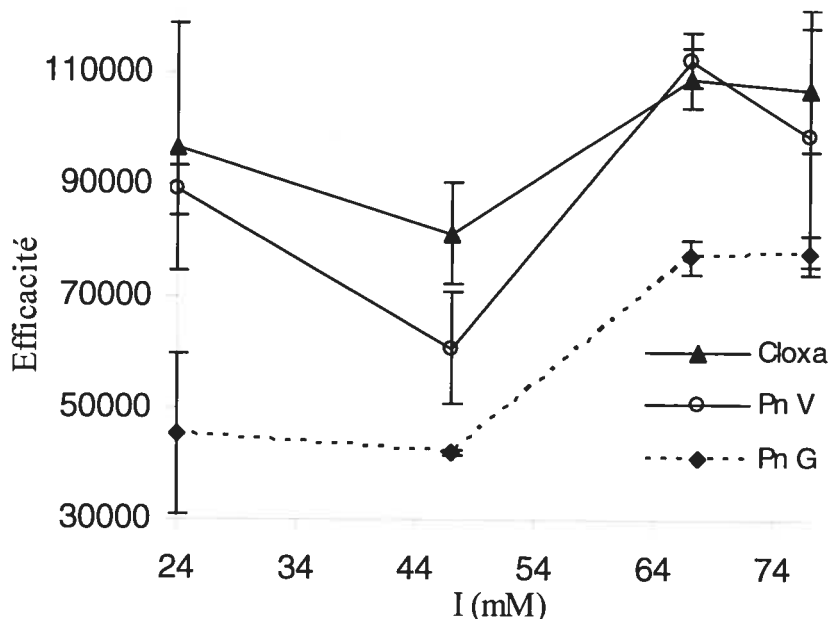


Figure 6.7 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité des pénicillines. pH 6,5; voir figure 6.6 pour les autres conditions expérimentales.

Tableau VI.II : Conditions de séparation des pénicillines.

Préconditionnement :	4 min tampon ; 2 min d'attente ; 4 min tampon		
Injection :	3 s à 50 mbar (5 nL)		
V / T / λ :	15 kV	25 °C	210 nm
Tampon :	NaH ₂ PO ₄ (23 mM) / Na ₂ HPO ₄ (8 mM) pH 6,4 ; I = 47 mM ; TBAp (60 mM)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,125 mM	eau	10 % MeOH

Un exemple d'électrophérogramme obtenu à partir de la méthode finale est disponible à la figure 6.8. Les paramètres analytiques usuels ont été déterminés à partir de la méthode finale de séparation des pénicillines (voir tableau VI.III). La reproductibilité des temps de migration des pics et des mobilités est située entre 1,3 et 7,4 % et celle de l'aire entre 1,6 et 8,8 %. Dans les deux cas, ce sont les reproductibilités des trois derniers pics qui ne sont pas satisfaisantes d'après les critères initialement établis au chapitre 1. Par contre, la faible reproductibilité ne semble tout de même pas assez sévère pour changer l'ordre relatif d'élution. L'efficacité est un autre paramètre dont les valeurs des deux derniers pics sont

insuffisantes ($< 90\ 000$), possiblement à cause d'une diffusion longitudinale excessive provenant de leur temps de migration très élevé.

Les seuls paramètres analytiques vraiment satisfaisants sont la LD, la LQ et la sensibilité de la méthode. Les LD sont effectivement dans les normes attendues (voir chapitre 1) pour cette instrumentation et les coefficients de corrélation des courbes d'étalonnage sont tout juste acceptables puisqu'ils se situent tous entre 0,950 et 0,996 pour le domaine de 0,02 à 0,22 mM. Les résultats analytiques de cette méthode sont en général peu concluants.

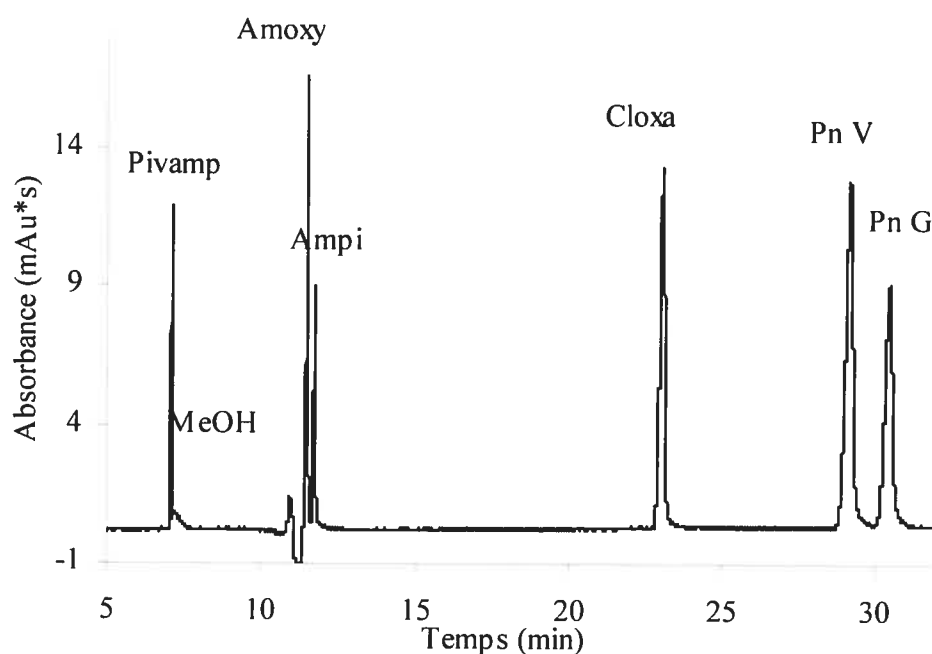


Figure 6.8 : Séparation des pénicillines ($c = 0,125$ mM) par ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 6,4; $I = 47$ mM), TBAP 60 mM; voltage 15 kV; injection 3 s (50 mbar).

Tableau VI.III : Résultats analytiques pour la séparation des pénicillines^a.

Composé	t_m (min)	$u_{app}(10^{-4})$ ($cm^2V^{-1}s^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
Pivamp	6,99(9)	3,07(4)	22,6(4)	-	2,2(3)	1,6(2)	5,3(7)
Amoxy	11,2(2)	1,91(4)	58(2)	54(5)	2,1(6)	1,9(2)	6,2(8)
Ampi	11,5(2)	1,87(4)	33(5)	2,5(2)	1,83(7)	2,2(3)	7,2(9)
Cloxa	22(1)	0,99(6)	133(9)	52(6)	1,2(5)	1,5(2)	5,1(7)
Pn V	27(2)	0,79(6)	190(20)	14(4)	5(3)	3,6(5)	12(2)
Pn G	28(2)	0,76(6)	140(10)	2,7(1)	7,7(4)	5,9(8)	20(3)

^a $N = 3$; ^b $LD = 3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c $LQ = 10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d(s) : 6,99(9) = $6,99 \pm 0,09$

Les résultats disponibles dans la littérature^{75,83,94,95} pour des méthodes ÉC/UV sont plus concluants que les résultats présentés au tableau VI.III pour la méthode actuelle en ce qui concerne les analytes qu'elles ont en commun. Ces auteurs présentaient des méthodes de 11 à 17 min pour de deux à quatre des six analytes qui ont été séparés par la méthode présentée dans ce projet. Ils ont obtenu des reproductibilités de 0,5 à 0,9 % pour les temps de migration pour des méthodes allant de 11 à 17 min^{75,94}. Les efficacités se situaient entre 70 000 et 260 000 pour toutes les pénicillines qu'ils ont sélectionnés⁹⁴. La méthode d'identification par CLHP de Santé Canada semblait aussi offrir de meilleurs résultats. Malgré le fait que la méthode présentée sépare de deux à quatre pénicillines de plus que la littérature étudiées^{75,83,94,95}, la méthode reste tout de même peu avantageuse sous sa forme présente à cause de lacunes dans la reproductibilité des temps de migration observés.

6.4 Conclusion

La méthode de séparation qui a été développée pour les pénicillines n'est pas au point à cause de problèmes important au niveau de la reproductibilité des temps de migration provenant d'interactions entre les analytes. Cette méthode devrait donc être grandement améliorée du point de vue de sa reproductibilité avant d'être considérée pour une utilisation routinière. Par exemple, une maximisation plus efficace de l'efficacité des pénicillines G et V pourrait être effectuée à partir de cette méthode ou, encore, des essais utilisant plutôt le CTAB comme additif pourraient être investigués.

7. SÉPARATION DES ANALGÉSQUES

7.1 Introduction

Les analgésiques non-stéroïdaux sont des médicaments couramment employés pour soulager la douleur et les inflammations⁹⁸. Un de ces analgésiques est l'aspirine (ASA) dont la structure est disponible à la figure 7.1. Il a été développé par la compagnie Bayer en 1899 et est l'un des plus universellement utilisés dans cette catégorie⁹⁹. Par contre, il entraîne un grand nombre d'effets secondaires selon la quantité et la fréquence d'administration. Sa stabilité est également fonction du milieu ambiant^{50,99}. Par exemple, il peut provoquer des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, agir comme anti-coagulant, etc.^{50,99}. D'autres analgésiques sont aussi disponibles selon le degré de douleur ressentie et les zones à cibler dans l'organisme^{65,100,101}.

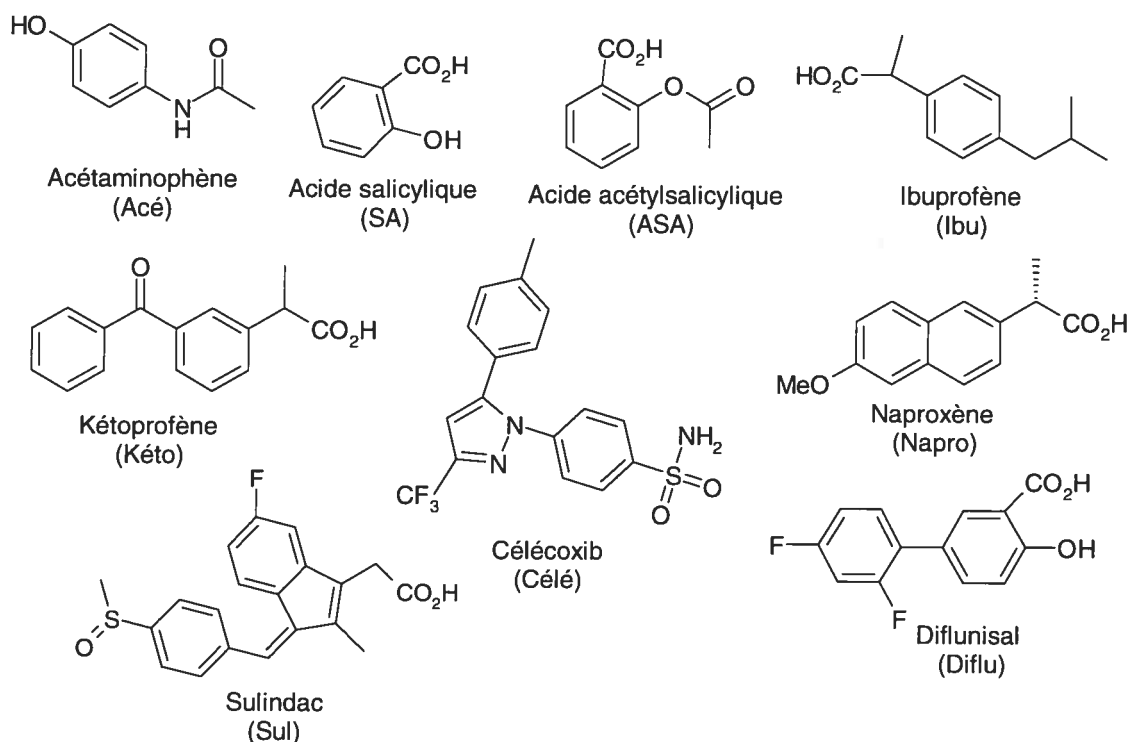


Figure 7.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation des analgésiques étudiés.

Une des particularités des analgésiques présentés est la grande diversité de leurs structures. Cette diversité est illustrée par les différences de propriétés physico-chimiques

(voir tableau VII.I) telles que les pK_a qui vont de 3 à 8^{50,101,102}. Deux de leurs points communs est qu'ils possèdent tous au moins un groupement aromatique qui facilite leur détection et qu'ils sont généralement anioniques²⁵. Certaines de ces drogues sont aussi chirales telles que l'ibuprofène (Ibu) et l'acétaminophène (Acé)¹⁰³. D'autres, telles que le naproxène (Napro), le kétoprofène (Kéto) et le sulindac (Sul), ont été développées spécifiquement pour être des anti-inflammatoires non-stéroïdaux plus acides et plus faiblement solubles dans l'eau¹⁰¹. La particularité de l'ASA est son instabilité selon le milieu environnant⁵⁰. En effet, il se dégrade dans le temps en acide salicylique (SA) avec l'humidité de l'air ou en milieu alcalin⁵⁰. L'Ibu est également instable puisqu'il est sensible à l'oxydation et à la décomposition thermique¹⁰⁴.

Tableau VII.I : Propriétés physico-chimiques des analgésiques^{50,101,102,104,105}.

Composé	MM (g/mol)	λ_{max} (nm)	pK_a	Solubilité à T_{AMB}
ASA	180,16	229 (H ₂ SO ₄)	3,49	Soluble dans l'eau à ~3 mg/mL et se dégrade en milieu alcalin et avec l'humidité.
Acé	151,16	250 (EtOH)	8,0	~ soluble dans l'eau froide et soluble dans le MeOH.
Ibu	206,28	-	~ 5	~ insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.
Napro	230,26	-	4,2	Insoluble dans l'eau et soluble dans le MeOH.
Sul	356,42	226, 256, 285, 327 (0,1 N HCl/MeOH)	4,7	Insoluble dans l'eau à pH <4,5 mais soluble à ~3 mg/mL à pH 7. Stable en milieu acide/basique.
SA	138,12	210, 234, 303 (EtOH)	2,98	0,2 % m/m dans l'eau.
Diflu	250,20	-	-	~ soluble dans l'eau.
Kéto	254,28	255 (MeOH)	4,0	~ soluble dans l'eau et soluble dans le MeOH.
Célé	381,38	-	-	-

Un grand nombre de méthodes de séparation par ÉC sont disponibles dans la littérature^{25,37,65,66,90,98-102,104,106-109}. Par contre, aucune des méthodes étudiées ne séparait plus de trois des neuf analgésiques sélectionnés d'où l'intérêt pour le développement d'une méthode appliquée spécifiquement à ces ingrédients actifs. Parmi ces méthodes, deux d'entre elles n'ont pas semblées avoir été maximisées^{99,100}. La première méthode de séparation d'analgésiques par ÉC a été développée en 1987 par Fujiwara et coll. et concerne l'ASA en relation avec ce projet¹⁰⁶. Une autre des méthodes étudiées est

particulièrement intéressante puisqu'elle est validée selon les recommandations présentées par l'USP^{37,104}. Cette méthode consiste à séparer la codéine de l'Ibu en 6 min par un tampon borate de pH 10 avec 40 mM de SDS et 9 % d'ACN sous un voltage appliqué de 10,5 kV^{37,104}.

Les autres méthodes ÉCÉ présentaient des temps d'analyse de 4 à 30 min en utilisant des tampons phosphates de pH 2 ou 11, borate ou phosphate/borate de pH 9 sous l'influence d'un voltage de 20 à 30 kV^{65,66,98,99,102,106,107}. Les méthodes de séparations par ÉCZ examinées utilisaient un tampon phosphate-borate, borate ou glycine de pH 9 ou un tampon phosphate de pH 2 à 7^{25,65,98,100,107}. L'application d'un voltage de 15 à 20 kV donnait des temps d'analyse entre 2,5 et 43 min^{25,65,98,100,107}. Quatre méthodes de séparation par ÉCZ/SM étaient aussi disponibles dans la littérature^{108,109}. Quant au groupe de Altria¹¹⁰, il a établi une méthode de séparation très générale pour une variété de produits pharmaceutiques dont l'ASA et l'Acé avec des temps de migration de moins de 3 min dans un tampon borate de 20 mM dont le pH n'est pas indiqué¹¹⁰. Finalement, le groupe de Fillet¹⁰¹ a maximisée une méthode de séparation non-aqueuse dans du MeOH pour séparer trois des analgésiques en 11 min.

7.2 Partie expérimentale

Initialement, plusieurs avenues tirées de la littérature^{25,37,65,66,98-100,102,104,106,107} ont été explorées telles que le choix de la valeur du pH (2, 7, 9 et 11) et de la nature du tampon mais la méthode finale ressemble davantage à celle de Donato et coll⁹⁸. Ils utilisaient un tampon phosphate de pH 7 afin de réaliser la séparation de divers anti-inflammatoires dont l'Ibu et le Napro sans toutefois mentionner le voltage appliqué pour leur méthode⁹⁸.

L'influence de plusieurs paramètres a été vérifiée sur la méthode de séparation développée. Les paramètres relatifs au tampon sont le pH (6 à 8), la force ionique (25 à 85 mM) et la quantité de SDS (0 à 85 mM). Les paramètres relatifs aux conditions de séparation sont le voltage (10 à 25 kV), le temps d'injection (1 à 4 s) à 50 mbar et le mode de préconditionnement. De plus, la matrice des standards a été variée pour faciliter la dissolution du célécoxib (Célé) et du diflunisal (Diflu). Un dernier point important à

mentionner par rapport à la maximisation est que la méthode de séparation a été initialement développée afin de séparer certains de ces analgésiques considérés comme étant prioritaires par Santé Canada. Ces analgésiques étaient l'ASA, la SA, l'Ibu, le Sul, le Napro et l'Acé. Ensuite, d'autres analgésiques non prioritaires (le Diflu, le Célé et le Kéto) ont été incorporés à la méthode afin d'en vérifier l'utilité générale. Il n'a pas été jugé nécessaire d'effectuer une seconde maximisation en incluant ces analgésiques additionnels.

7.2 Résultats et discussion

Plusieurs tampons ont été initialement testés en solution libre parce que quatre des cinq pK_a étaient connus. Un tampon glycine de pH 9, trois tampons phosphate de pH 2, 7 et 11 ainsi qu'un tampon borate de pH 9 ont été testés. Avec le tampon phosphate en milieu acide, la migration était beaucoup trop longue puisque aucun pic n'était visible après 25 min, probablement à cause d'un faible FÉO obtenu lorsque le pH est inférieur ou égal à 3. Le tampon borate n'offrait également pas de résultat concluant puisque le courant généré par le tampon au voltage sélectionné était nettement insuffisant pour des solutions de forces ioniques variées. Pour ces analytes, utiliser un tampon phosphate de pH 11 résultait en une sélectivité légèrement plus faible par rapport au pH neutre. Un pH aussi élevé devrait entraîner une dégradation rapide du capillaire, généralement par dissolution de la silice. Dès le premier essai avec le tampon phosphate de pH 7, cinq pics ont été obtenus pour un mélange des analytes suivants : l'ASA, l'Ibu, le Sul, le Napro et l'Acé. Par contre, lorsque les paramètres ont été variés lors d'une première maximisation, un sixième pic s'est dissocié du flux électro-osmotique. En injectant individuellement les cinq analgésiques, ce nouveau pic a pu être associé à celui de l'Acé. Puisque cinq pics étaient initialement attendus, un des six pics devait donc être identifié. La première hypothèse était que ce pic devait être celui du SA, un produit de dégradation de l'ASA. En effet, deux des trois méthodes d'analyse de l'ASA obtenues de la littérature^{66,99} permettaient de l'identifier. Puisque la solution de standards était aqueuse, une certaine dégradation était attendue d'après les propriétés physico-chimiques de l'analyte même dans le cas de standards récents^{50,66,99,110}. En solution aqueuse, cette dégradation semblait s'effectuer sur une échelle de plusieurs heures. Après avoir varié le voltage, le pH, la force ionique et le temps d'injection, l'Acé était toujours partiellement intégré au FÉO. Il devait donc être le seul de

ces six analytes à avoir une charge négative faible ou quasi nulle dans ces conditions expérimentales. Ceci pourrait être dû à l'effet de résonance du groupement amide de la molécule sur la distribution de sa charge. Cette proximité avec le FÉO ainsi que son impact sur l'apparence du pic de l'Acé avait aussi été notée par Suntornsuk entre les pH 5 et 6¹⁰². Selon ces observations, le SDS avait alors été ajouté comme surfactant malgré l'obtention d'une sélectivité suffisante pour tous les autres analytes par ÉCZ. Son ajout a eu un impact suffisamment important pour qu'une bonne séparation de tous les analytes soit alors observée.

Une maximisation des facteurs pouvant influencer la séparation a alors été effectuée à partir de la méthode initiale dont les conditions sont disponibles à la figure 7.2. Les barres d'erreurs ne sont pas représentées dans ces graphiques des temps de migration puisqu'elles sont inférieures à 1,1 %. Tel qu'illustré par cette figure, le pH du tampon utilisé a un impact important sur la séparation. Les temps de migration du Sul, du Napro et de l'Ibu sont réduits de près de la moitié dans l'intervalle étudié. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les pK_a de ces analytes se trouvent entre 4,2 et 5. Ils sont donc plus près de l'intervalle de pH étudié que ceux des autres analytes. Selon la figure 7.2, deux valeurs de pH auraient pu être choisies soit un pH de 6,4 ou de 7,0 pour une sélectivité optimale. Le pH initialement choisi était de 7,0 puisque les analytes étaient bien séparés et la méthode était ainsi plus rapide. Les autres paramètres de la méthode de séparation ont alors été maximisés. Par contre, après ces maximisations, il a été constaté que les pics étaient légèrement trop rapprochés et cela rendait l'identification plus difficile. Le pH a donc été maximisé de nouveau pour conserver une valeur de 6,4. La séparation semblait ainsi rencontrer les critères désirés afin d'effectuer l'analyse finale.

D'après la figure 7.3, une variation de la force ionique a, quant à elle, eu peu d'impact sur la sélectivité de la séparation. Les temps de migration des six analytes variaient peu entre 25 et 75 mM de force ionique et l'ordre d'élution était conservé sur tout l'intervalle. Son influence sur l'efficacité des pics a aussi été déterminée et est davantage significative pour trois des analytes (voir figure 7.4). Par contre, il est important de mentionner que la comparaison des efficacités pour les pics de l'ASA et du SA est relative à cause de la dégradation de l'ASA en SA dans le temps. La séquence effectuée pour la maximisation durait plus de 9 h (24 injections) et la concentration des deux analytes variait donc

grandement au cours de cette période de temps. La force ionique finale choisie a été de 63 mM puisque l'efficacité de l'Acé y était maximale pour un temps d'analyse semblable sur la presque totalité de l'intervalle étudié. L'efficacité plus faible du pic de l'Acé est due à sa quasi co-migration avec le FÉO qui fausse son apparence.

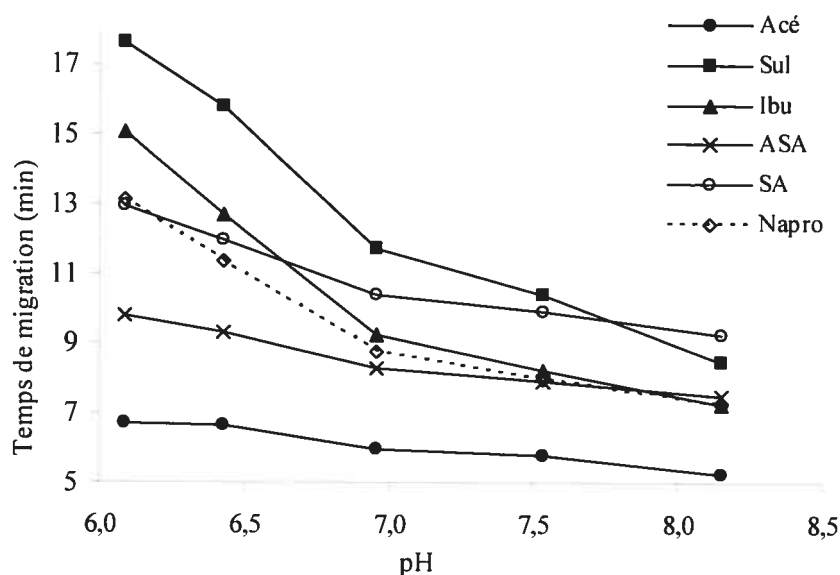


Figure 7.2 : Influence du pH de la solution tampon sur le temps de migration des analgésiques. Tampon phosphate ($I = 63$ mM), SDS 55 mM; voltage 12 kV; injection 3 s (50 mbar).

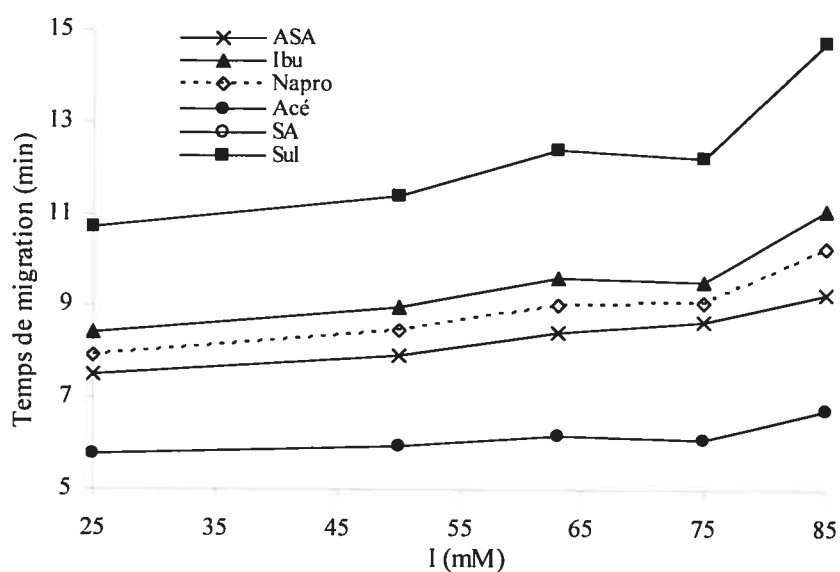


Figure 7.3 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur le temps de migration des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.

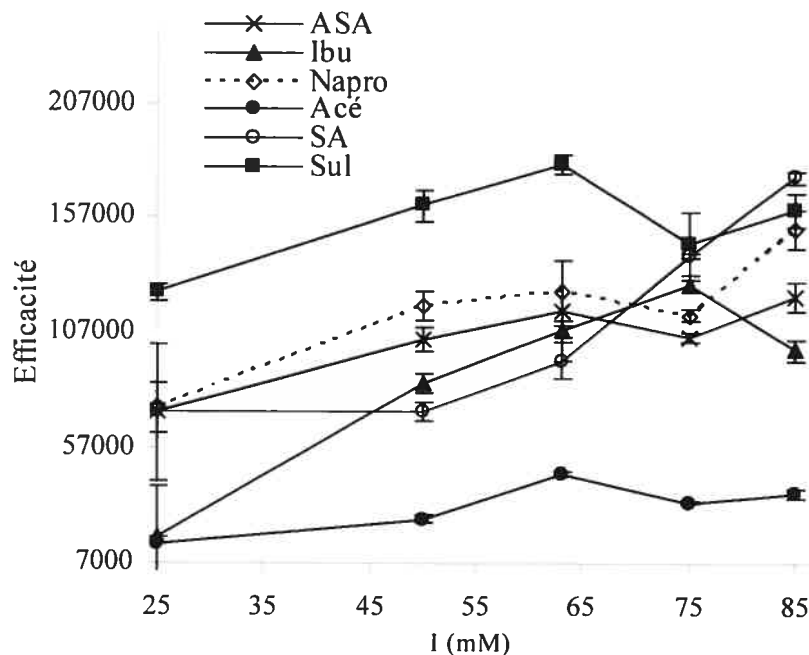


Figure 7.4 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.

Le dernier paramètre maximisé relatif au tampon a été la quantité de surfactant ajoutée. D'après la figure 7.5, on peut constater que la concentration en SDS a un impact important sur la migration des analgésiques, surtout pour le Sul et l'Ibu alors qu'il est minime pour l'ASA et le SA. La faible influence sur ces deux derniers analytes pourrait être expliquée par le fait que ce sont des molécules anioniques de plus petite taille et plus hydrophile qui ne présentent que peu d'interactions avec les micelles anioniques. Un autre point intéressant à noter est que le Sul et l'Ibu étaient également très affectés par une variation du pH. Cela pourrait être expliqué par le fait qu'elles seraient plus hydrophobes à charges égales. La concentration de SDS choisie a été de 55 mM, parmi un domaine satisfaisant variant entre 55 et 85 mM, pour effectuer l'analyse finale parce que le temps d'analyse était alors légèrement plus court avec une séparation acceptable de l'Acé du FÉO.

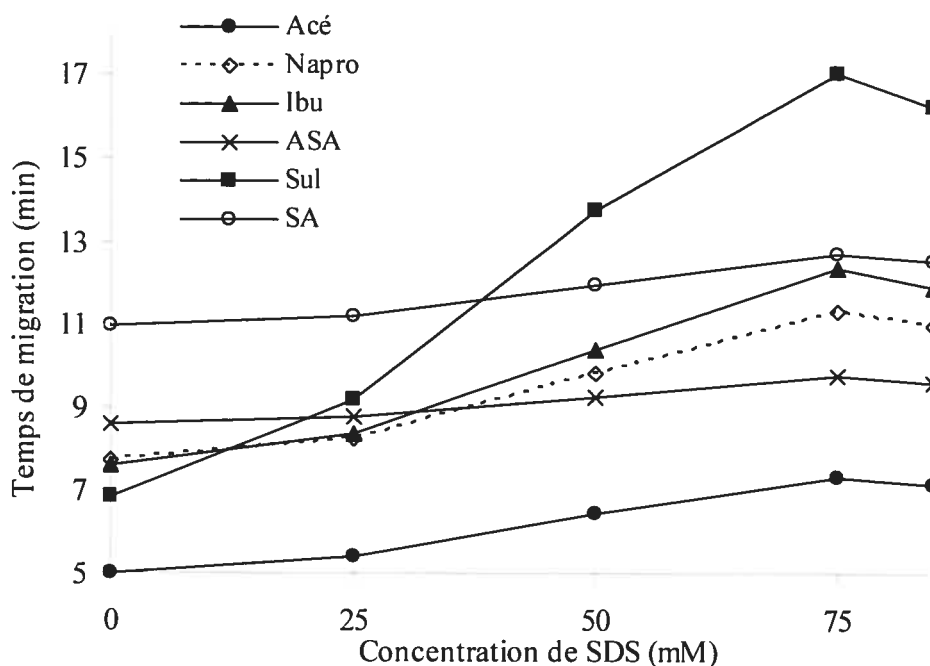


Figure 7.5 : Influence de la concentration de surfactant sur les temps de migration des analgésiques. pH 7,0; voir figure 7.2 pour les autres conditions expérimentales.

L'influence des conditions relatives au système, comme le voltage et le temps d'injection, a également été vérifiée. Une variation du voltage entre 10 et 25 kV n'a pas semblé avoir un effet majeur sur l'efficacité du Napro, de l'Ibu et de l'ASA. Une augmentation considérable de l'efficacité a toutefois été constatée dans le cas du SA et du Sul tandis que celle de l'Acé diminuait légèrement avec l'augmentation du voltage. Un voltage de 25 kV et un temps d'injection de 1,5 s (2 nL) ont été choisis pour une résolution minimale de 2,2 pour l'ensemble des analytes.

La maximisation de la proportion de MeOH et d'eau dans la solution de l'échantillon ainsi que des essais relatifs au mode de préconditionnement ont ensuite été effectuées. La quantité de MeOH dans la solution des standards a été variée entre 10 et 50 % et une proportion de 30 % a semblé entraîner une plus grande efficacité pour l'Ibu. Selon le groupe de Swartz⁶⁶, la présence de MeOH dans la matrice avec un tampon contenant du SDS aurait une influence négative sur les micelles ce qui affecterait l'efficacité et l'apparence générale du pic⁶⁶. Au-delà de 30 %, des phénomènes d'élargissement ou de dédoublement de pics et même de chute ou de discontinuité marquée du courant pourraient être rencontrés^{11,111}. Puisque la méthode d'analyse était plus performante en mode ÉCÉM,

le préconditionnement a été choisi comme tel. La méthode de préconditionnement du mode ÉCZ a quand même été testée afin de vérifier son utilité potentielle. Un préconditionnement de type ÉCZ a effectivement démontré une plus faible reproductibilité puisqu'un coefficient de variation de 2,5 % a été obtenu par rapport au 1,1 % obtenu avec un préconditionnement de type ÉCÉM. Les conditions maximisées de la méthode étaient alors constituées d'un tampon phosphate de pH 6,4 avec une force ionique de 63 mM ajouté de 55 mM de SDS. Le capillaire était sous l'influence d'un voltage de 25 kV, d'un préconditionnement de type ÉCÉM et les analytes, dissous dans une matrice de 30 % MeOH dans de l'eau, ont été injectés pendant 1,5 s (2 nL). Un exemple d'électrophérogramme résultant de cette méthode est disponible à la figure 7.6. L'influence de la température d'analyse sur la sélectivité de la séparation aurait aussi pu être vérifiée puisque le groupe de Fillet¹⁰¹ y accordait une grande importance pour le Sul, le Napro et le Kéto.

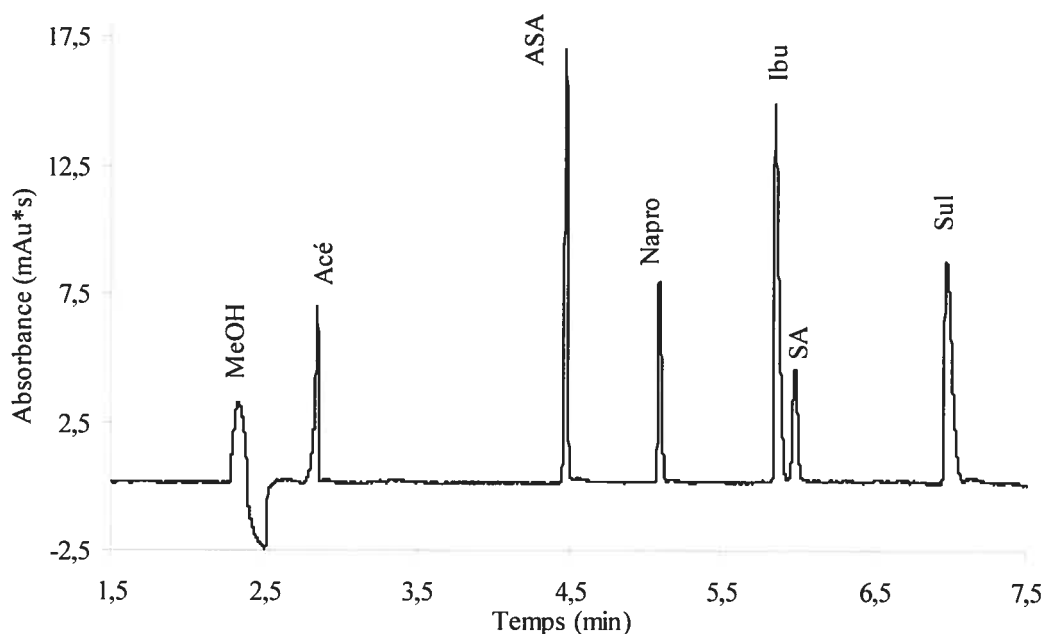


Figure 7.6 : Séparation de six analgésiques ($c = 0,23$ mM) par ÉCÉM. Tampon phosphate (pH 6,4; $I = 63$ mM), SDS 55 mM; voltage 25 kV; injection 1,5 s (50 mbar).

Après avoir maximisé tous les paramètres, la méthode a été testée sur des mélanges contenant aussi d'autres analgésiques : le Diflu, le Célé et le Kéto. Cet ajout a été effectué car le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada était intéressé à savoir si la méthode pouvait également accommoder d'autres analgésiques. La matrice a dû être basifiée à

l'aide d'une solution de NaOH 0,005 *N* afin de faciliter la dissolution du Diflu et du Célé. Ce changement a toutefois aussi eu pour effet de grandement diminuer la stabilité de l'ASA. En effet, l'analyse devait maintenant être effectuée en moins de 30 min après la mise en solution afin d'observer un pic pour l'ASA. En absence de NaOH, une dégradation beaucoup plus lente du ASA en SA avait été observée puisque ce pic était toujours visible même après des séquences qui pouvaient durer plusieurs heures. Cette méthode d'analyse pouvait donc maintenant permettre la séparation des neuf analgésiques étudiés. Les conditions de séparation sont disponibles dans le tableau VII.II. On peut, entre autres, y constater que le marqueur est inclus dans la matrice servant à dissoudre les différents analgésiques.

Tableau VII.II : Conditions de séparation des analgésiques.

Préconditionnement :	4 min tampon ; 2 min d'attente ; 4 min tampon		
Injection :	1,5 s à 50 mbar (2 nL)		
V / T / λ :	25 kV	25 °C	200 nm
Tampon :	NaH ₂ PO ₄ (29 mM) / Na ₂ HPO ₄ (11 mM) pH 6,5 ; I = 63 mM ; SDS (55 mM)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,29 mM	30 % MeOH / NaOH 0,005 <i>N</i>	-

Un exemple d'électrophérogramme de la séparation finale est disponible à la figure 7.7. On peut y voir que la sélectivité est très bonne et que l'efficacité est suffisante pour tous les analytes. Des essais ont ensuite été effectués afin de déterminer la charge des trois nouveaux analgésiques puisque celles des autres avaient déjà été trouvées. La migration de ces trois analytes en absence du surfactant a montré que le Diflu et le Kéto (ce qui est conforme au pK_a connu^{50,101,102} de cet analyte) étaient anioniques. Le temps de migration de Kéto est près de celui du Napro, de l'Ibu et de Sul puisque leurs pK_a sont similaires. Quant au Célé, il ne porte pas de charge parce qu'il migre avec le FÉO. Sa migration est donc très influencée par la présence de SDS lors de la séparation. Il est important de rappeler que la maximisation de la méthode a été effectuée seulement avec les six premiers analytes.

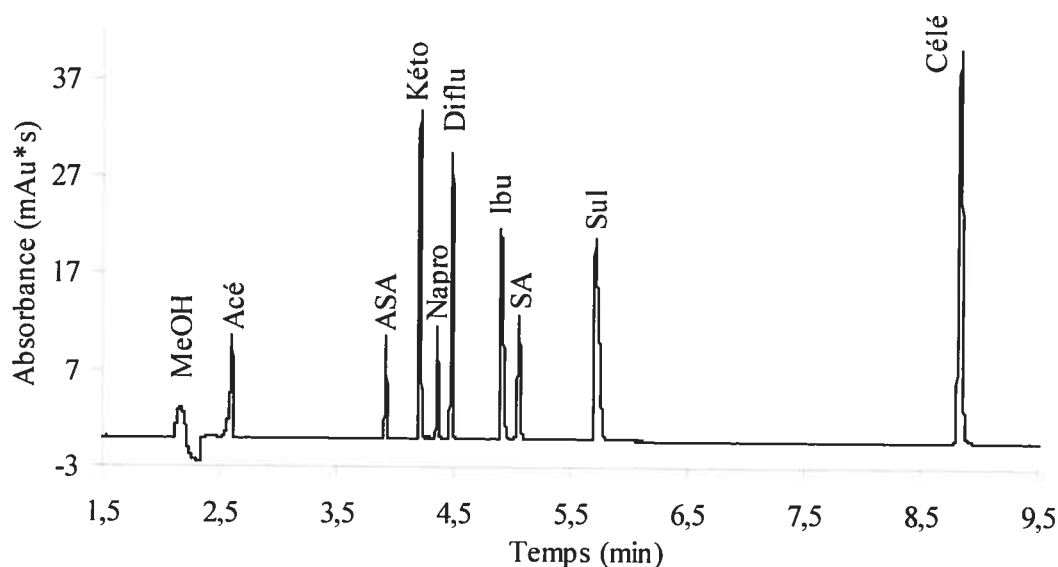


Figure 7.7 : Séparation de neuf analgésiques ($c = 0,29$ mM) par ÉCÉM. Tampon phosphate (pH 6,5; $I = 63$ mM), SDS 55 mM; voltage 25 kV; injection 1,5 s (50 mbar).

Les paramètres analytiques obtenus pour l'analyse finale ($N = 3$) sont présentés au tableau VII.III. Les résultats de la méthode à six analytes sont aussi présentés au tableau VII.IV. Ils sont donnés à titre comparatif puisque la méthode finale sélectionnée reste celle des neuf analgésiques. Les différences expérimentales entre ces deux méthodes sont le nombre d'analytes, la matrice utilisée ainsi que la concentration de certains analgésiques. La matrice des neuf analgésiques contient du NaOH tandis que celle des six n'en contient pas. La sélectivité de la méthode avec NaOH est amplement suffisante puisque la résolution minimum entre deux pics est de 3,1 et une bonne reproductibilité est observée pour les temps de migration. Les coefficients de variation se situent entre 0,3 et 1,1 % pour les temps de migration et les mobilités apparentes. La reproductibilité de l'aire de tous les pics, sauf ceux de l'ASA et du SA, est bonne parce qu'elle se trouve entre 0,7 et 2,7 %. L'exactitude des domaines de linéarité de cette méthode est passable puisque les coefficients de corrélation se situent entre 0,971 et 0,999 pour un domaine de concentration de 0,04 à 0,38 mM pour tous les analytes sauf le ASA et le SA. Les LD des analytes se trouvent cependant toutes dans l'ordre de grandeur attendu.

Pour l'ASA et le SA, la reproductibilité de l'aire est de 66 et 25 % à cause du phénomène de dégradation très rapide discuté précédemment. Lorsque les aires des pics de ces deux analytes sont additionnées, la reproductibilité devient meilleure (9,0 %) mais reste

toutefois insuffisante par rapport aux normes établies. La quantification de ces analytes est par conséquent impossible à partir de cette méthode. Par contre, en l'absence de NaOH, cette reproductibilité est acceptable puisqu'elle est de 2,7 % pour le ASA et de 13 % pour son produit de dégradation qu'est le SA. Une reproductibilité pour l'aire de l'ASA de 1,8 % a été rapportée par le groupe de Honda¹⁰⁶ en l'absence de NaOH dans la matrice. La comparaison de la valeur calculée sans NaOH pour l'ASA indique qu'il y a encore place à amélioration de la méthode développée dans le cas présent. En présence de NaOH, il est aussi important de mentionner que les LD calculées pour l'ASA et le SA sont approximatives par le phénomène de dégradation qui augmente l'incertitude de ces résultats. En effet, le domaine de linéarité et la LD de la méthode avec NaOH n'ont pas pu être déterminés par la méthode standard parce que la dégradation du ASA en SA était trop rapide pour le nombre d'injections nécessaire. Donc, la méthode de calcul de la LD qui a été préférée est celle utilisée par Santé Canada selon les directives de la direction des médicaments¹¹². Elle consiste à injecter l'échantillon un certain nombre de fois à une concentration qui est approximativement dix fois celle de la LD. La LD est ensuite établie par le rapport des hauteurs comme étant trois fois le signal sur le bruit de fond¹¹². Puisque l'échantillon est injecté selon une concentration connue, cette valeur peut ensuite être convertie en μM . Toutefois, en l'absence de NaOH, les valeurs des LD du ASA et du SA sont meilleures puisqu'elles sont respectivement de 0,9 et de 1,0 μM . De plus, les coefficients de corrélation des domaines de linéarité se situent entre 0,987 et 0,989 pour un domaine de concentration de 0,02 à 0,27 mM. Ces LD sont donc meilleures que celles trouvées par le groupe de Colyer⁹⁹ (2 à 3 μM).

Tableau VII.III : Résultats analytiques pour la séparation de neuf analgésiques^a.

Composé	t_m (min)	u_{app} (10^{-4} $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
Acé	2,60(1) ^f	5,00(2)	17,3(3)	-	0,69(2)	2,9(6)	10(2)
ASA	3,90(2)	3,33(2)	6(4)	38(2)	3,1(7)	$\sim 4^d$	$\sim 13^e$
Kéto	4,18(2)	3,11(2)	39,2(5)	9,2(6)	2,4(4)	0,8(2)	2,7(6)
Napro	4,33(3)	3,00(2)	13,7(1)	4,3(2)	2,7(1)	2,6(6)	9(2)
Diflu	4,45(3)	2,92(2)	33,5(2)	3,5(3)	2,5(7)	0,9(2)	3,2(7)
Ibu	4,85(5)	2,68(3)	36,1(7)	9,3(5)	1,4(1)	1,7(4)	6(1)
SA	5,02(4)	2,59(2)	29(7)	3,13(3)	2,1(2)	$\sim 4,4(7)^d$	$\sim 14,6(7)^e$
Sul	5,65(6)	2,30(2)	52,0(8)	10,1(2)	0,82(3)	1,8(4)	6(1)
Célé	8,78(5)	1,48(1)	87(2)	40(2)	2,3(5)	1,0(2)	3,4(8)

^a $N = 3$; ^b $LD = 3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c $LQ = 10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d $LD = 3 \times s/b \times c$; ^e $LQ = 10 \times s/b \times c$; ^f (s) : 2,60(1) = $2,60 \pm 0,01$

Plusieurs des paramètres analytiques avec et sans NaOH dans la matrice pour l'Acé, le Napro, l'Ibu et le Sul donnent des résultats équivalents. En effet, quoique les temps de migrations soient affectés par la présence de NaOH dans la matrice, la reproductibilité des temps de migration, des mobilités apparentes et de l'aire restent similaires. Cette constatation s'applique aussi à la résolution et à l'efficacité. Sans NaOH, les coefficients de variation des temps de migration et des mobilités apparentes sont de 0,5 à 0,7 % et ceux de l'aire sont de 0,3 à 2,7 %. Quant aux domaines de linéarité, leurs coefficients de corrélation se situent entre 0,973 et 0,992 pour un domaine de concentration de 0,02 à 0,27 mM.

Tableau VII.IV : Résultats analytiques pour la séparation de six analgésiques^a.

Composé	t_m (min)	u_{app} (10^{-4} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
Acé	2,80(1) ^d	4,65(2)	10,91(4)	-	0,73(6)	2,3(6)	8(2)
ASA	4,36(2)	2,98(2)	22,2(6)	40(3)	2,5(3)	0,9(2)	2,9(8)
Napro	4,92(4)	2,64(2)	22,2(1)	15,7(9)	2,4(1)	2,0(5)	7(2)
Ibu	5,64(4)	2,31(2)	31,7(7)	14,8(9)	1,6(2)	1,3(3)	4(1)
SA	5,78(4)	2,25(1)	8(1)	2,4(2)	1,7(1)	1,0(3)	3,4(9)
Sul	6,70(5)	1,94(1)	27,9(6)	13,3(2)	1,1(2)	2,2(6)	7(2)

^a N = 3 ; ^b LD = 3 x (DS/(dR/dC)) ; ^c LQ = 10 x (DS/(dR/dC)) ; ^d(s) : 2,80(1) = 2,80 ± 0,01

Les résultats de cette méthode de séparation pour neuf analgésiques ont pu être comparés à ceux des méthodes de séparation d'analgésiques disponibles dans la littérature^{25,37,65,66,98-100,102,104,106,107} utilisant le même type de détecteur. Des reproductibilités de 0,34 à 1,7 % sur les temps de migration et de 0,35 à 2,3 % sur l'aire des pics ont été obtenues avec des temps d'analyse variant entre 2 et 18 min pour des méthodes ne permettant de séparer que jusqu'à trois des analytes étudiés à la fois^{25,37,65,66,98-100,102,104,106,107}. Les LD rapportées pour ces méthodes se situent entre 2 et 14 μM avec des courbes dont les coefficients de corrélation sont de 0,998 à 0,999 alors que leurs efficacités se trouvent entre 90 000 et 160 000^{25,37,65,66,98-100,102,104,106,107}. Il peut donc en être conclu que la méthode développée dans le cadre de ce projet est au moins équivalente ou supérieure en ce qui concerne la majorité des paramètres analytiques calculés. Elle permet également la séparation d'un bon nombre d'analgésiques qui n'ont pas été couverts dans la littérature^{25,37,65,66,98-100,102,104,106,107}. Enfin, l'analyse de cette série de neuf analgésiques selon une méthode par CLHP/UV de Santé Canada n'a pas permis la séparation de l'Acé et

du SA pour une séparation de 20 minutes mais dont les LD sont environ 20 fois inférieures à celles obtenues par ÉC/UV.

7.4 Conclusion

La méthode de séparation de neuf analgésiques développée dans le cadre de ce projet pourrait être utilisée afin d'effectuer des essais qualitatifs et quantitatifs. En effet, la sélectivité, la reproductibilité et la sensibilité obtenues sont suffisantes pour la majorité de ces composés. De plus, cette méthode offre un temps d'analyse compétitif par rapport aux autres méthodes disponibles. Par contre, une révision de la composition de la matrice serait nécessaire afin d'augmenter la stabilité de l'ASA car la quantification simultanée des neuf analgésiques est très difficile dans les conditions présentes. L'utilisation de la matrice initiale sans NaOH pourrait le permettre pour les cinq premiers analgésiques. De plus, il aurait été pertinent d'effectuer la maximisation de la méthode comprenant l'ensemble des analytes inclus dans l'analyse finale.

8. SÉPARATION CHIRALE DU VALSARTAN

8.1 Introduction

Les méthodes de séparation chirales sont particulièrement intéressantes en EC parce qu'elles permettent de réduire substantiellement les coûts d'analyse. En effet, la séparation d'énantiomères par CLHP s'effectue grâce à des mécanismes de reconnaissance chirale généralement inclus dans la phase stationnaire. L'achat de telles colonnes chirales engendre des coûts importants². De plus, la sélectivité et l'efficacité des méthodes qui résultent de leur utilisation sont souvent moins intéressantes^{113,114}. En EC, l'utilisation d'additifs chiraux dans le tampon réduit ces coûts et permet un meilleur contrôle des paramètres de séparation. Dans le cadre de la méthode de séparation présentée dans ce chapitre, deux additifs chiraux ont été étudiés, soit la β -cyclodextrine (β -CD) (fig. 8.1) et la γ -cyclodextrine (γ -CD). Les CD sont des oligosaccharides neutres qui contiennent un nombre variable d'unités α -(1,4)-D-glucopyranose. Ce nombre d'unités est de sept pour la β -CD tandis qu'il est de huit pour la γ -CD. La structure tridimensionnelle des CD présente une cavité dont l'intérieur est hydrophobe et l'extérieur est hydrophile¹¹⁵. L'inclusion d'analytes aux dimensions appropriées par rapport à la taille de l'ouverture de la cavité est donc permise tout en maintenant une certaine solubilité de la CD en milieu aqueux¹¹⁵. Les CD ne sont pas des cônes rigides mais plutôt des cavités modifiables (cône tronqué) selon la molécule incluse et la température¹¹⁵. La formation d'un complexe entre l'analyte et la CD dépend de facteurs spatiaux, d'interactions hydrophobiques, de ponts hydrogènes et d'effets de solvations¹¹⁵. La sélectivité chirale proviendrait donc des différences d'affinité entre les énantiomères pour former un complexe avec la CD.

Puisque les CD sont les additifs chiraux les plus utilisés en EC, leurs mécanismes d'action sont donc davantage détaillés¹¹⁶. La majorité des études rapportées soutiennent un rapport analyte:CD de 1:1¹¹⁷. De manière plus pratique, la β -CD ne devrait pas influencer le FEO (μ_{eo}) contrairement aux couronnes d'éther^{107,114,118}. L'ajout de ces dernières ferait diminuer le FEO en complexant le sodium présent dans le capillaire. La CD influencerait plutôt la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) des analytes^{107,114}. Les autres paramètres influençant l'inclusion sont la concentration en CD et en ion OH⁻ (pH), la forme spatiale de

l'analyte (taille et densité électronique), les interactions hydrophobes, les ponts hydrogènes, les effets de solvation (effet entropique) ainsi que la température (effet cinétique entraînant de l'effet Joule : $k' \propto 1/T$)^{115,119,120}. Selon Wren et coll.¹¹⁴, l'influence de la quantité de CD sur la sélectivité suivrait une fonction logarithmique. En effet, la résolution augmenterait rapidement pour atteindre un maximum autour d'une certaine concentration pour ensuite diminuer progressivement. Cette diminution serait attribuable à une forme de surdose en additif qui entraînerait la formation d'un équilibre diminuant les différences de temps de complexation entre les deux énantiomères¹²¹.

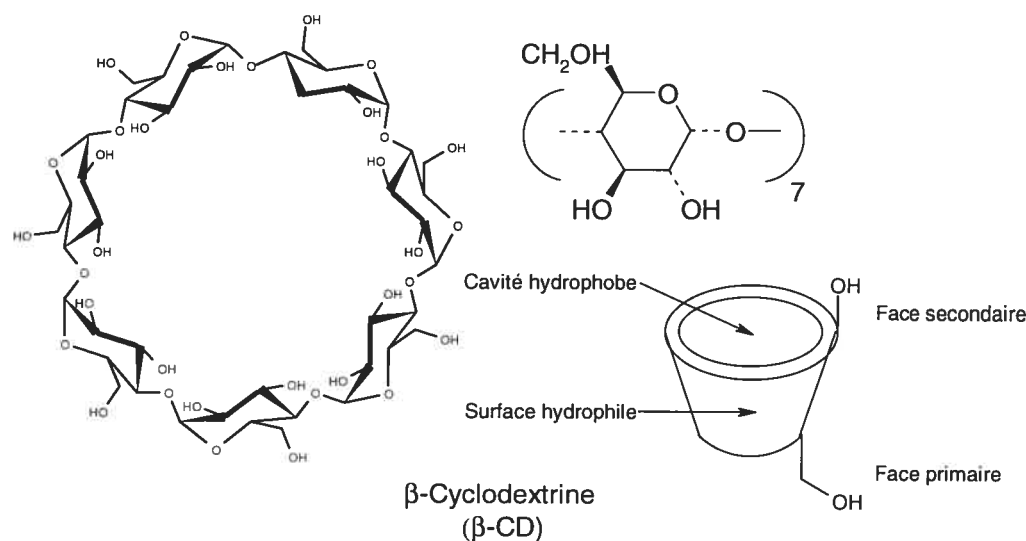


Figure 8.1 : Structure moléculaire, tridimensionnelle, nom et abréviation de la β-CD.

L'analyse des drogues chirales est extrêmement importante pour le domaine pharmaceutique car elles sont très nombreuses. De plus, généralement, seule l'une des formes énantiomériques d'une drogue démontre une activité biologique bénéfique alors que l'autre énantiomère peut parfois même présenter une haute toxicité comme dans le cas notoire de la thalidomide¹²². Puisque les propriétés physiques d'énantiomères sont normalement identiques à part de leur pouvoir rotatoire, leur séparation par des méthodes plus conventionnelles devient particulièrement difficile. La séparation chirale du valsartan (R,S-Val) par ÉC semblait donc un sujet d'étude très pertinent (fig. 8.2). Dans cette figure, la structure de l'urée est aussi donnée car elle a aussi été utilisée comme additif lors de la séparation.

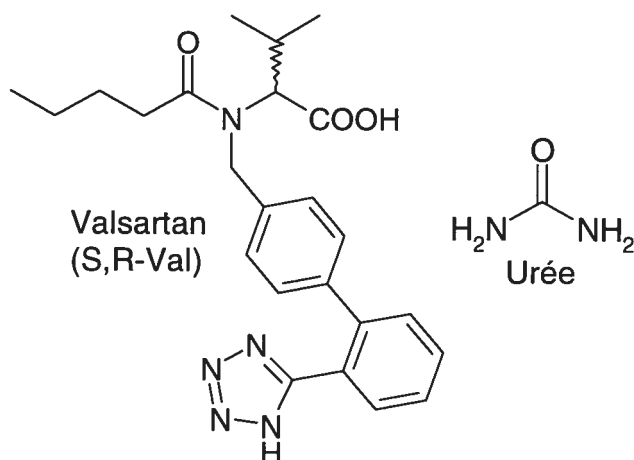


Figure 8.2 : Structure moléculaire, nom et abréviation du valsartan et de l'urée.

Le valsartan est un composé de nature amphotérique qui contient un cycle biphenyltétrazole dont le pK_a se situe entre 3 et 6^{123,124}. Il est efficace dans le traitement de l'hypertension et de problèmes cardiaques^{125,126}. Les antagonistes du récepteur de l'angiotensine II, tel que le valsartan, sont des médicaments disponibles commercialement depuis peu (~1997)¹²⁶. Ils sont plus efficaces que les médicaments utilisés précédemment parce qu'ils bloquent sélectivement le récepteur I relié, entre autre, à la vasoconstriction tout en laissant le récepteur II intact¹²⁵. La présence du R-Val comme impureté du S-Val est réglementée et elle ne doit pas excéder une proportion de 1,5 % par rapport à l'ingrédient actif. Les essais par CLHP n'ont pas été concluants pour doser le R-Val dans un produit commercial. Une méthode de séparation alternative a alors dû être développée afin de quantifier cette impureté dans un produit commercial.

À l'époque de la mise au point de la méthode de séparation aucune des méthodes par ÉC de la littérature^{124-126,127-131} ne permettait la séparation chirale du R,S-Val. La masse molaire du valsartan est de 435,53 g/mol mais les autres propriétés physico-chimiques usuellement rapportées du Val ne sont pas disponibles (pK_a , λ_{max} et solubilité)^{50,107,121}. Les méthodes d'analyses achirales par ÉC utilisaient des tampons phosphate/borate (pH 5,5), phosphate avec et sans SDS (pH 2,5; 6,5 et 7,2) et borate avec et sans SDS (pH 9,0 et 9,5) dans des capillaires de 30 à 85 cm sous un voltage de 10 à 25 kV pour un temps d'analyse variant entre 6 et 20 min^{124-126, 127-131}.

8.2 Partie expérimentale

Les premiers tests ont été inspirés par une méthode chirale pour d'autres analytes¹³² ainsi que des méthodes de pH neutre en mode ÉCZ pour cet analyte¹³⁰. Puisque l'addition seule de la CD était insuffisante pour obtenir une bonne sélectivité, plusieurs additifs ont été étudiés dont l'urée. L'addition de cet additif devait permettre d'augmenter la solubilité de la β -CD ajoutée afin d'obtenir une bonne résolution chirale. Il a été rapporté que l'urée serait un choix moins compétitif pour la CD versus certains analytes que le MeOH ou l'ACN¹³³.

Les paramètres étudiés étaient le pH (6,2 à 7,0) et la force ionique (25 à 80 mM) du tampon phosphate, la nature et la quantité de CD (0 à 50 mM de β -CD ou de γ -CD), la nature et la quantité d'autres additifs (25 à 85 mM de SDS, 25-50 mM de TBAP, 20 % de 1-propanol ou de 1,5-3,0 M d'urée), le voltage (15 à 25 kV) et le temps d'injection (1 à 4 s).

8.3 Résultats et discussion

Les premiers tampons à avoir été testés étaient un tampon phosphate de pH 6,5 en mode ÉCZ et en mode CD-ÉCÉ avec de la β -CD et 20% de 1-propanol. L'ajout du 1-propanol a été suggéré par Wells¹³² parce que, selon ses études, la solubilité de la β -CD est alors grandement accrue. En effet, une solution de 60 mM en β -CD peut ainsi être obtenue lorsque le tampon contient 20 % de 1-propanol¹³². De plus, il serait possible que cet ajout ait une influence positive sur la sélectivité du complexe constitué de l'analyte et de la CD¹³². Par contre, l'ajout de MeOH ou de 1-butanol ne suffit pas à cette tâche¹³². Tel que suggéré par Wells¹³², la température d'analyse a été fixée à 30 °C afin de faciliter la solubilisation de la CD en évitant, autant que possible, de nuire à la résolution chirale¹³².

Tel qu'attendu, aucune séparation chirale n'a été obtenue en mode ÉCZ mais un pic de forme standard était visible avec un temps de migration de 9 min correspondant à des analytes porteurs de charges négatives dans ces conditions. Avec l'ajout de 30 mM de l'additif chirale, le temps de migration du pic était de 24 min et un épaulement était visible.

En ajoutant l'additif chiral en présence de 1-propanol à la limite de la solubilité, deux pics devenaient visibles. À partir des conditions de départ, plusieurs essais ont été effectués afin d'augmenter la résolution : le pH a été varié, la CD a été changée (γ vs β) et du SDS a été ajouté. Individuellement, une augmentation du pH ou l'ajout de surfactant augmentait la résolution entre les deux énantiomères ($R = 1,0$). Par contre, une diminution du pH ou l'utilisation de la γ -CD n'était pas des options avantageuses. La plus grande taille de la γ -CD n'est pas adéquate pour celle des analytes et cela cause une baisse de sélectivité. Une résolution plus grande était donc attendue en augmentant simultanément le pH et la quantité de surfactant en présence de β -CD. Lorsque la concentration en SDS était supérieure à 75 mM, une perte totale de résolution a été observée et l'analyse elle-même devenait instable. Puisqu'une sélectivité suffisante ne pouvait pas être obtenue dans ces conditions, d'autres avenues ont été considérées. Le surfactant a été remplacé par l'agent de pairage ionique TBAP qui avait été utilisé pour les pénicillines (voir chapitre 6). Une résolution équivalente a été trouvée ($R = 1,0$) et une augmentation de sa concentration n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. L'ajout d'un agent de pairage ionique ou d'un surfactant a été écarté parce que la sélectivité atteignait alors une valeur maximale insuffisante. Les maximisations du voltage, du temps d'injection et de la force ionique ont été effectuées à partir des meilleures conditions trouvées, soit un pH de 7 et une concentration de 50 mM en β -CD. Une résolution inférieure à 1,5 a été trouvée.

Après investigation, l'utilisation d'urée dans le tampon semblait être une voie intéressante puisque cela avait permis la séparation chirale de certains analytes¹³³. En effet, Li et coll. avaient constaté que l'urée pouvait à la fois aider à la solubilité de la CD et à la séparation chirale en intervenant moins dans le complexe hôte/analyte que d'autres modificateurs organiques¹³³. En utilisant les meilleures conditions expérimentales en présence d'urée, une résolution supérieure à 1,5 a été obtenue. De plus, une résolution de 2,0 a été obtenue en augmentant la concentration de CD et d'urée. Par contre, une certaine proportion doit être respectée entre les deux additifs afin de maintenir une bonne solubilité pour le tampon. Expérimentalement, il a été observé que le tampon n'est pas un mélange homogène si une concentration insuffisante d'urée ou une force ionique trop grande est employée.

La maximisation des différents paramètres de la méthode a alors pu être initiée. L'effet du pH de séparation ainsi que celui de la force ionique ont été vérifiés. En variant le pH de la solution tampon, on a constaté que la sélectivité entre les deux isomères sur l'intervalle étudié restait stable mais que le temps de migration diminuait rapidement avec le pH pour ensuite se stabiliser (voir figure 8.3). Cet effet inattendu est avantageux puisque le FÉO ne devrait varier que peu sur cet intervalle. L'influence de la force ionique sur l'efficacité se traduit aussi sous forme d'un plateau lorsqu'une certaine concentration est dépassée. En effet, telle qu'illustrée à la figure 8.4, lorsque la force ionique est supérieure à 50 mM, la grandeur moyenne de l'efficacité devient plus stable quoique plus imprécise. Puisque le temps de migration augmentait avec la force ionique, une valeur intermédiaire de 49 mM a été choisie. Celle-ci permettait aussi d'obtenir une meilleure précision sur les deux valeurs. De plus, pour le S-Val dont l'efficacité était plus faible, un maximum a été atteint à ce point de l'intervalle.

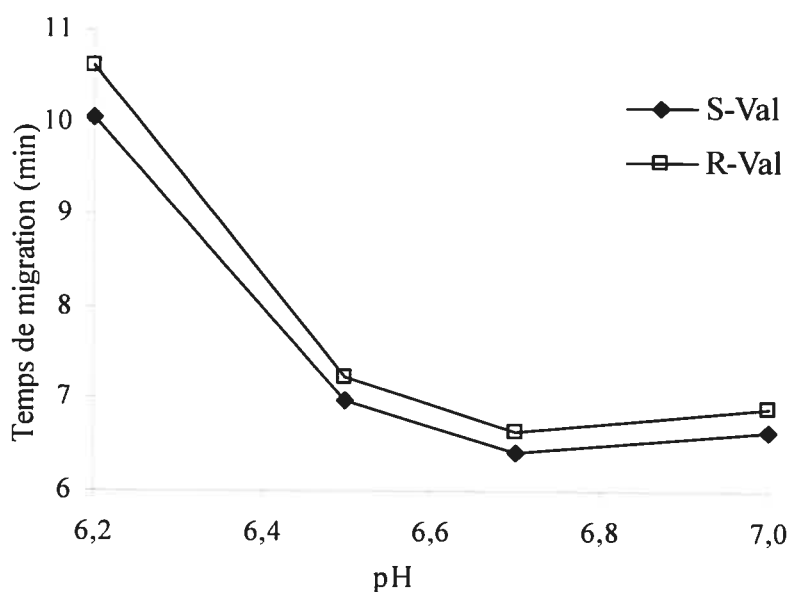


Figure 8.3 : Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration du valsartan. Tampon phosphate, β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 3 s (50 mbar).

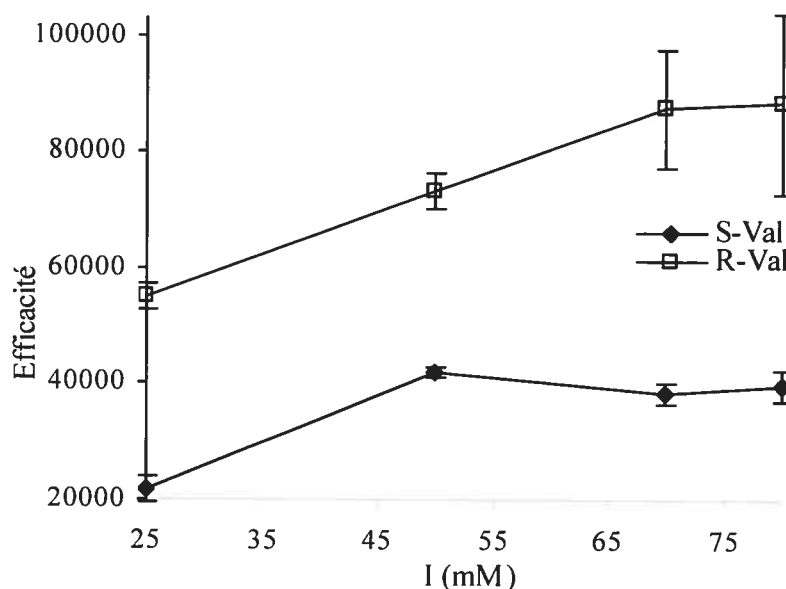


Figure 8.4 : Influence de la force ionique de la solution tampon sur l'efficacité du valsartan. pH 7,0; voir figure 8.3 pour les autres conditions expérimentales.

Les effets du voltage appliqué et du temps d'injection sur la qualité de la séparation (efficacité des pics et temps de migration des analytes) ont aussi été vérifiés. Un effet de plateau des efficacités a aussi été observé lorsque le voltage était inférieur à 23 kV. Puisque dans ce plateau, les temps de migration étaient deux fois plus courts à un voltage plus élevé, une valeur de 23 kV a été choisie pour une incertitude plus faible par rapport à un voltage de 25 kV, ce qui est possiblement dû à de l'effet Joule. Un temps d'injection de 1,5 s (2 nL) a, quant à lui, été sélectionné pour ses effets sur l'efficacité du S-Val.

L'effet des additifs est particulièrement important pour cette méthode parce qu'ils permettent une bonne sélectivité chirale qui n'aurait pas pu être obtenue avec les premiers tampons utilisés. La concentration minimale nécessaire en additif chiral doit être de 13 mM afin d'obtenir une séparation partielle entre le R- et le S-Val (voir figure 8.5). Une concentration de 50 mM a été sélectionnée pour une résolution maximale. Pour la concentration en urée, une sélectivité suffisante est obtenue sur tout l'intervalle étudié. Tel qu'introduit précédemment, le choix de sa concentration (2 M) a été influencé par la stabilité de la combinaison des deux additifs.

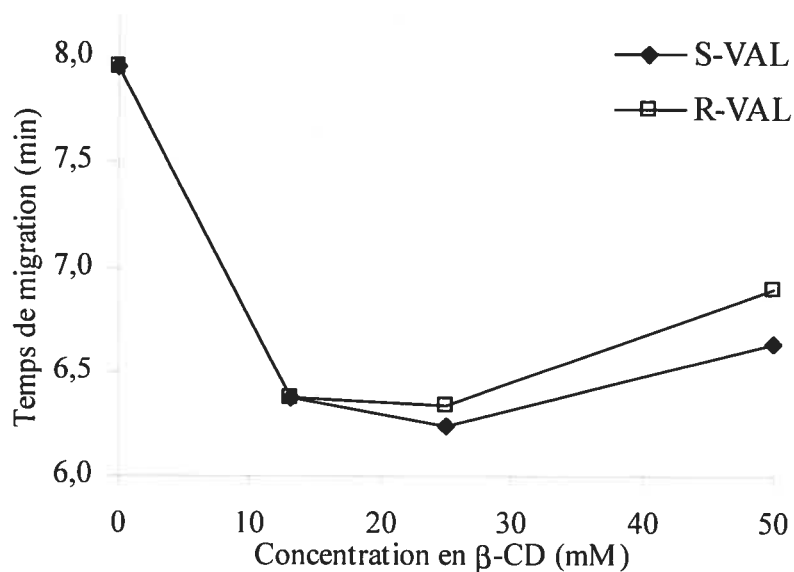


Figure 8.5 : Influence de la concentration en β -CD sur les temps de migration du valsartan. pH 7,0; voir figure 8.3 pour les autres conditions expérimentales.

Pour cette méthode, l'influence du préconditionnement n'a pas été vérifiée. De plus, le mode de préconditionnement choisi était du type normalement exécuté pour une séparation en mode ÉCZ. La raison de ce choix est qu'un lavage au NaOH semblait être plus efficace pour nettoyer l'intérieur du capillaire des CD qui pourraient s'y accumuler puis l'obstruer. La matrice du standard qui a été utilisée était constituée à 10 % de NaOH 0,1 *N* afin de faciliter la dissolution de l'hydrochlorothiazide (HCT) dont la structure est présentée à la figure 8.6^{125,129}. Ce composé dont les pKa sont de 7,9 et 9,2⁵⁰ est l'un des deux ingrédients actifs présents dans le médicament administré. Cet acide faible est employé en tandem avec le S-Val afin d'aider à l'excrétion urinaire des sels par les reins^{130,131}. Il serait éliminé à plus de 95 % dans l'urine et serait également utile pour prévenir l'hypertension en diminuant le volume sanguin^{130,131}.

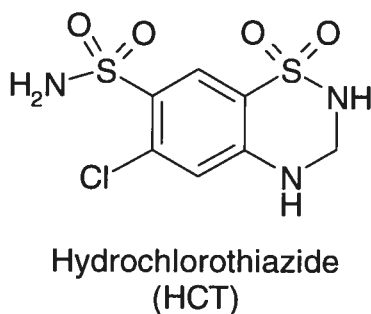


Figure 8.6 : Structure moléculaire et abréviation de l'hydrochlorothiazide.

Tableau VIII.I : Conditions de séparation chirale du valsartan.

Préconditionnement :	3 min NaOH ; 2 min d'attente ; 2 min d'eau ; 4 min tampon		
Injection :	1,5 s à 50 mbar (2 nL)		
V / T / λ :	23 kV	30 °C	214 nm
Tampon :	NaH ₂ PO ₄ (10 mM) / Na ₂ HPO ₄ (13 mM) pH 7,0 ; I = 49 mM ; β -CD (50 mM) ; Urée (2 M)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,24 mM	10 % 0,1 N NaOH/eau	-

La méthode finale de la séparation chirale du R,S-Val est disponible dans le tableau VIII.I. La figure 8.7 représente un électrophérogramme typique pour cette séparation chirale. La sélectivité de la méthode est excellente et le temps d'analyse est raisonnable.

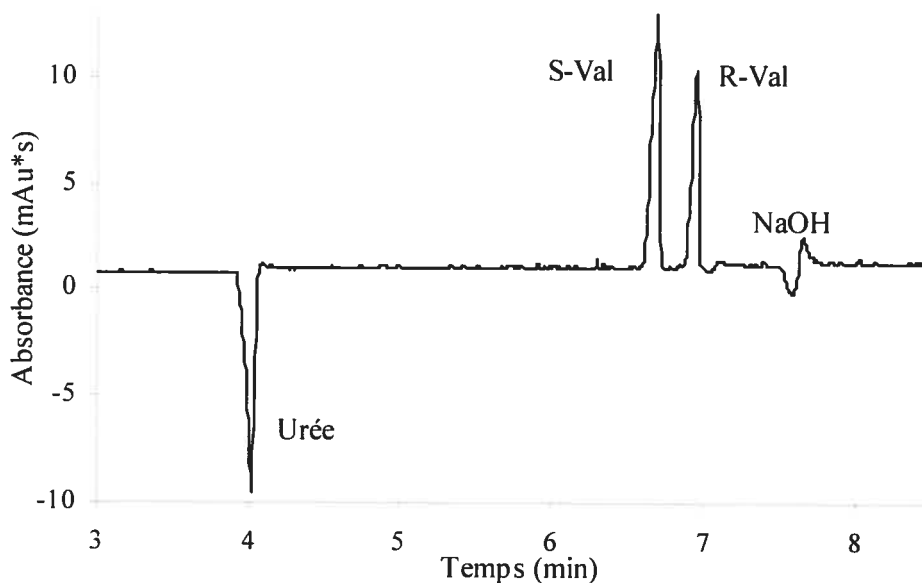


Figure 8.7 : Séparation chirale du valsartan (c = 0,24 mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; I = 49 mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar).

Les paramètres analytiques usuels ont ainsi pu être calculés pour cette méthode (voir tableau VIII.II). La résolution obtenue pour cette méthode est effectivement très bonne, soit de 2,73 pour une méthode d'analyse de 7 min. La reproductibilité de la méthode pour les temps de migration et la mobilité apparente des deux énantiomères est excellente puisque les CV se situent entre 0,09 et 0,10 %. La reproductibilité de l'aire est acceptable puisque les CV sont de 1,2 % pour le S-Val et de 2,0 % pour le R-Val. Par contre,

l'efficacité du S-Val pourrait être plus grande selon les normes prédéfinies (voir chapitre 1). À l'opposé de l'efficacité, la LD provenant de la courbe de sensibilité par rapport à la hauteur des pics est très bonne. Les facteurs de corrélation qui en ont été tirés se situent entre 0,985 et 0,993, ce qui est un peu faible pour un domaine de 0,03 à 0,31 mM.

Tableau VIII.II : Résultats analytiques pour la séparation chirale du valsartan^a.

Composé	t_m (min)	u_{app} (10^{-4} $cm^2V^{-1}s^{-1}$)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
S-Val	6,690(6) ^d	2,141(2)	39,9(5)	-	0,70(2)	0,86(9)	2,9(3)
R-Val	6,948(7)	2,061(2)	27,8(6)	2,73(6)	0,99(5)	0,60(7)	2,0(2)

^a $N = 3$; ^b $LD = 3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c $LQ = 10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d(s) : 6,690(6) = $6,690 \pm 0,006$

Il s'agit de la première méthode de séparation chirale à avoir été développée par ÉC. De plus, cette méthode s'est avérée être beaucoup plus efficace et économique que la méthode chirale par CLHP/UV infructueusement développée précédemment par Santé Canada.

8.4 Dosage

En utilisant la méthode de séparation chirale développée par ÉC avec de la β -CD, des tests de robustesse face à différentes proportions des deux énantiomères ont été effectués dans le but éventuel de l'appliquer à un échantillon réel. En effet, puisque la proportion limite acceptable en R-Val est de 1,5 % pour un échantillon commercial de S-Val selon Santé Canada, la méthode devait être suffisamment flexible pour obtenir des résolutions satisfaisantes autour de cette concentration. Un mélange standard de S-Val contenant 1 % de R-Val a été injecté à plusieurs reprises ($n = 5$) afin de vérifier certains des paramètres analytiques tels que la reproductibilité, l'efficacité et la résolution. Un exemple d'électrophérogramme pour ces tests est disponible à la figure 8.8. L'efficacité du S-Val obtenue était faible (5400) mais celle du R-Val était satisfaisante (329 600). Ces résultats correspondent bien au fait que pour éviter un élargissement des pics, il faut que la concentration des analytes soit cent fois inférieure à celle de l'ÉDF. De plus, la résolution calculée entre ces deux analytes était de 0,32. Cette faible résolution a été obtenue, malgré un retour à la ligne de base entre les deux pics, puisque le pic du S-Val est grandement déformé. En effet, un facteur d'asymétrie moyen de 9,2 est trouvé pour ce pic,

probablement à cause de la grande quantité de produit injecté pour ces analyses. En effet, la concentration maximum d'analytes qui avait été injectée jusqu'alors était de 0,62 mM tandis que celle de ces analyses était six fois plus grande. La reproductibilité des temps de migration et des mobilités apparentes était de 0,83 à 0,84 % alors que celle de l'aire était de 2,0 % pour les deux analytes. De plus, le nouveau domaine de linéarité du S-Val pour une concentration de 0,03 à 4,09 mM mène à un coefficient de corrélation de 0,969 pour une même LD. Ces résultats ont été jugés comme étant satisfaisants afin de permettre l'analyse du médicament selon les normes préétablies par Santé Canada.

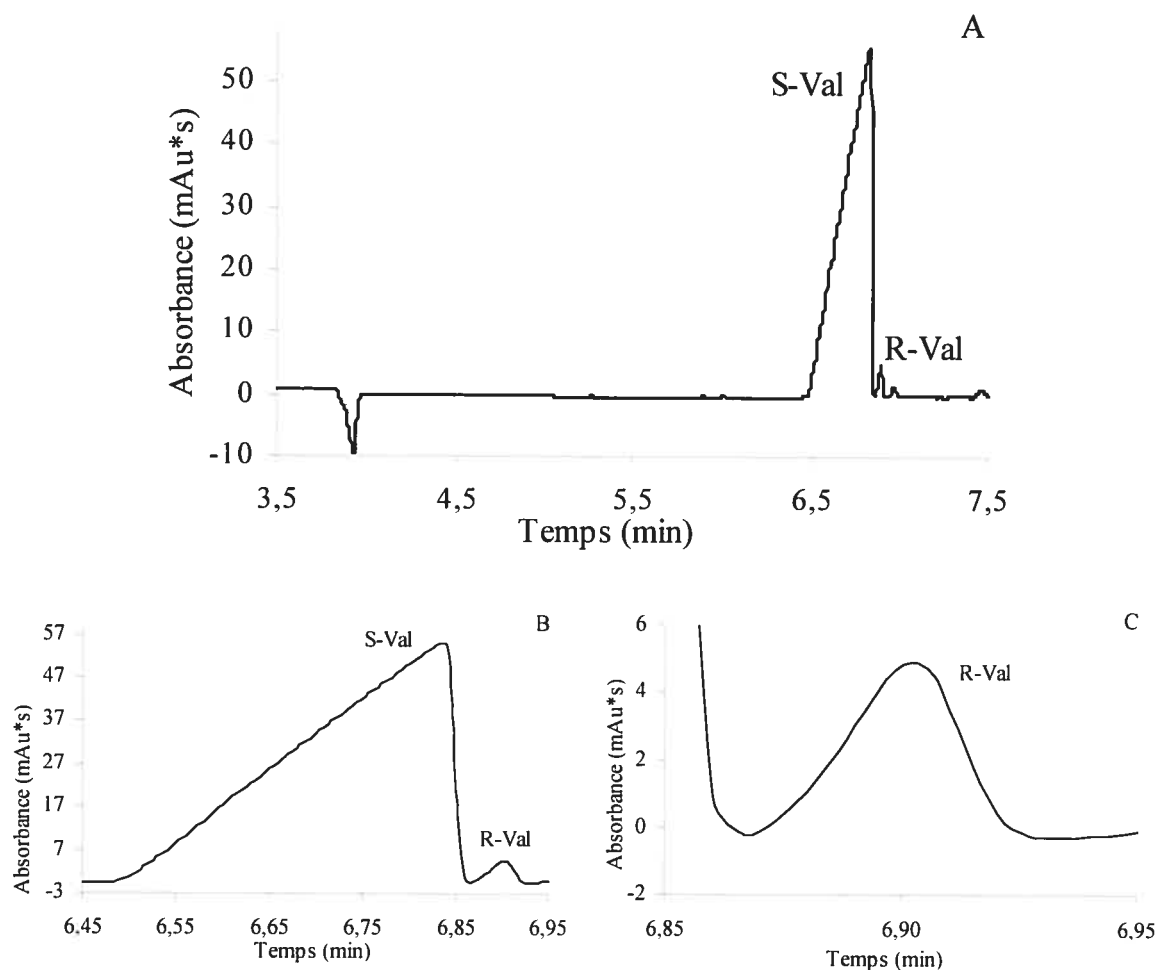


Figure 8.8 : Section A : séparation du valsartan pour une solution standard de 1 % R-valsartan / S-valsartan ($c_R = 0,04$ mM, $c_S = 4,09$ mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; $I = 49$ mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar). Sections B et C : Agrandissements de la section A.

La méthode de quantification utilisée pour l'analyse du produit commercial de S-Val est celle employée par Santé Canada. Elle consiste à broyer 20 comprimés du médicament afin de déterminer le poids moyen d'un seul comprimé. En estimant ensuite que la concentration de S-Val déclarée par le fabricant est exacte, on dilue de manière à obtenir la concentration désirée pour effectuer l'analyse. Trois solutions de l'échantillon sont préparées et injectées en duplicata.

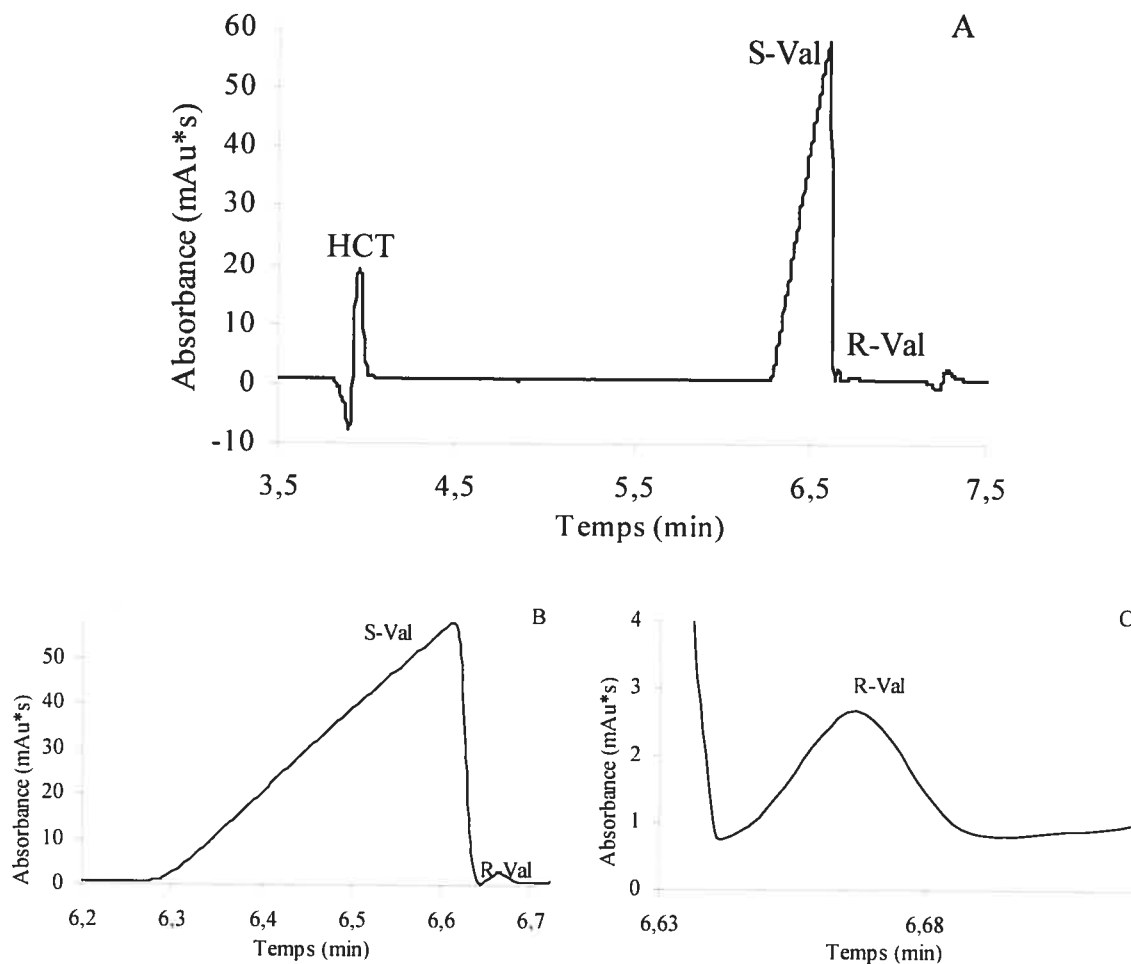


Figure 8.9 : Section A : dosage d'un échantillon commercial de valsartan ($c_s = 3,67$ mM) par CD-ÉCÉ. Tampon phosphate (pH 7,0; $I = 49$ mM), β -CD 50 mM, urée 2 M; voltage 23 kV; injection 1,5 s (50 mbar). Sections B et C : Agrandissements de la section A.

L'électrophérogramme de l'échantillon commercial de ce médicament est disponible à la figure 8.9 où les pics des deux énantiomères ainsi que le pic du HCT sont identifiés. Par contre, puisqu'il y a coélution de l'urée et du HCT, ce dernier ne peut pas être dosé par

cette méthode. Une nouvelle maximisation de la méthode pourrait être entreprise afin d'en permettre la quantification. Suite aux calculs de dosage, il a été déterminé que la quantité de R-Val présente dans le S-Val ne dépassait pas les normes établies puisque sa proportion relative moyenne n'était que de $(0,57 \pm 0,03) \%$ avec un CV de 5,0 %.

8.5 Conclusion

L'efficacité des séparations chirales constitue l'un des principaux avantages de l'ÉC par rapport à d'autres techniques dont la CLHP à cause des faibles coûts impliqués pour effectuer les analyses. Une excellente méthode de résolution du R,S-Val a ainsi été développée pour la première fois par CD-ÉCÉ. Elle a également permis la qualification et la quantification du R-Val présent comme impureté dans un échantillon pharmaceutique réel de S-Val disponible commercialement.

9. SÉPARATION DE SENNOSIDES

9.1 Introduction

Les laxatifs existent sous plusieurs classes dont les sennosides (SN) qui sont des stimulants⁴⁵. Ils sont administrés lorsque l'alimentation n'offre pas un apport suffisant en fibres, lorsque certains médicaments constipants sont consommés tels que les analgésiques narcotiques et les antidépresseurs tricycliques ou pour contrer ce symptôme dans le cas de maladies plus graves comme l'hypothyroïdie⁴⁵. Au Canada, les SN sont disponibles en vente libre sous la forme de produits naturels. Par contre, ils ne devraient pas être utilisés plus d'une semaine à la fois afin de ne pas causer d'effets dommageables à moyen ou long terme tels que des crampes abdominales ou de la paresse intestinale^{45,46}. Les SN agissent spécifiquement en augmentant le péristaltisme du côlon⁴⁶. Ils peuvent provenir, entre autres, de deux espèces de *cassia* (*caesalpiniaceae*), soit le *cassia acutifolia* et le *cassia angustifolia*^{134,135}. Les feuilles et les racines de ces plantes contiennent majoritairement les SN A, B et A1 dans une proportion de plus de 80 % alors que les formes C, D et D1 sont minoritaires¹³⁵⁻¹³⁷. Les SN A et B y sont les plus abondants et actifs¹³⁵⁻¹³⁷.

Tels qu'illustrés à la figure 9.1, les SN sont des acides faibles qui ont une structure de base du type dianthrone^{50,138,139}. Les étalons internes (ÉI) qui ont été étudiés pour réaliser les essais sur la stabilité ainsi que les dosages sont aussi représentés dans cette figure. L'acide benzoïque (AB) avait été sélectionné comme ÉI par le groupe de Sheu¹⁴⁰. Après plusieurs essais, l'acide anthraquinone-2-carboxylique (AAC) a été sélectionné comme ÉI parce qu'avec sa structure similaire, il a permis de couvrir une fenêtre de migration acceptable et de faciliter la comparaison avec les SN. Les deux SN analysés sont des diastéréoisomères puisque les SN A et B sont respectivement de forme *trans* et *méso*¹⁴⁰. En effet, la différence de structure se situe au niveau de la liaison unissant les deux parties cycliques de la molécule¹⁴⁰. Le SN A peut s'isomériser lentement en SN B dans une solution de NaHCO₃ à 80 °C (voir tableau IX.I)⁵⁰. De plus, la solubilité du SN A serait maximale lorsqu'un mélange de 30 % masse sur masse d'eau dans du méthanol serait utilisé⁵⁰. Quant à la solubilité du SN B, elle serait légèrement supérieure dans les mêmes conditions.

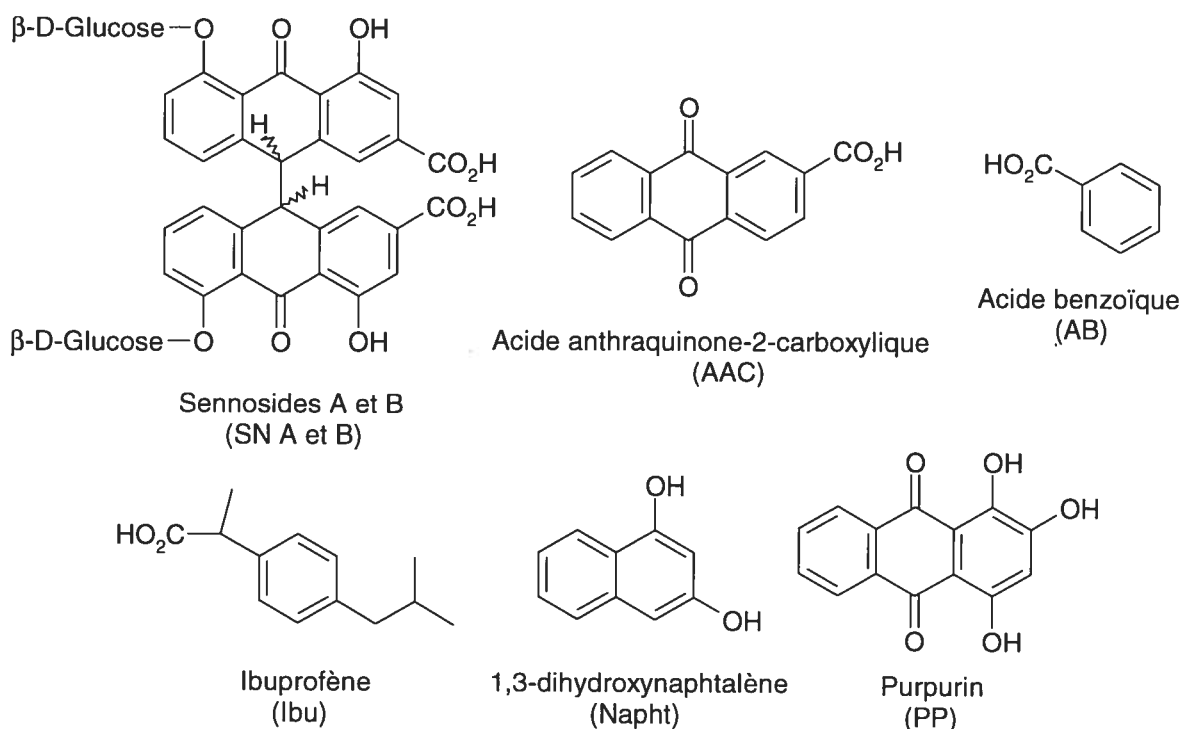


Figure 9.1 : Structure moléculaire, nom et abréviation des sennosides et des étalons internes étudiés.

Tableau IX.I : Propriétés physico-chimiques des sennosides et des étalons internes^{18,50,105}

Composé	MM (g/mol)	λ_{\max} (nm)	pK _a	Solubilité à T _{AMB}
SN A	862,74	-	-	Insoluble dans l'eau, ~ soluble dans le MeOH. S'isomérisé en SN B en solution basique à 80 °C.
SN B	862,74	270, 308, 355 (0,5 % NaHCO ₃)	-	Plus soluble que le SN A dans les mêmes conditions.
AAC	252,23	-	-	Soluble dans l'EtOH.
AB	122,12	-	1,00	Soluble dans l'eau et l'EtOH.
Ibu	206,28	-	~ 5	~ insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants organiques.
Napht	160,17	-	-	Soluble dans l'eau et l'EtOH.
PP	256,21	-	-	~ Soluble dans l'eau et soluble dans l'EtOH.

Pour le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada, l'objectif principal était de procéder à des études de stabilité et à des dosages d'échantillons commerciaux en plus de maximiser la méthode de séparation. Le développement d'une méthode de séparation des SN A et B était important puisque le contenu des produits naturels est peu règlementé au

Canada. Des échantillons de produits naturels ont donc été sélectionnés par le laboratoire pharmaceutique de Santé Canada et ils seront ici désignés par un nombre entre 1 et 6 due à des clauses de confidentialité. Pour la maximisation de la méthode d'analyse, il paraissait plus avantageux de modifier les conditions de séparation à partir d'un de ces six produits commerciaux puisque le résultat final devait permettre la quantification en présence d'un grand nombre d'impuretés. De plus, trois standards de SN différents ont été utilisés au cours de ce projet : les SN A et B isolés de Fluka ainsi que le mélange de A et B de USP. Les standards de Fluka ont été utilisés afin de déterminer les paramètres analytiques de la méthode finale d'analyse ainsi que l'étape A des essais sur la stabilité. Afin de simplifier le traitement des données, le standard USP a quant à lui été utilisé pour ensemencer l'échantillon à l'étape C. Ensuite, les six produits commerciaux ont pu être dosés avec la méthode développée. De plus, le standard USP a aussi été quantifié par cette méthode.

Plusieurs méthodes de séparation des SN par ÉC sont disponibles dans la littérature^{135,138,140-142}. Les méthodes en mode ÉCZ utilisaient un tampon borate dont le pH se situait entre 8,4 et 10,5 et contenait un modificateur organique (11 % d'ACN¹⁴⁰, 5 % de 1-propanol¹³⁵) ou, encore, un tampon cholate (pH 7,3) qui contenait 66 % d'ACN^{135,140-142}. En appliquant un voltage de 23 à 25 kV, la séparation était effectuée en 11 à 25 min dans un capillaire de 66 à 90 cm^{135,140-142}. Une des méthodes de séparation utilisait un mode ÉCÉM à l'aide de SDS avec un tampon phosphate de pH 9,34 et 33 % d'ACN dans un capillaire de 94 cm pour un voltage de 25 kV et un temps d'analyse de moins de 20 min¹³⁸. Trois de ces cinq méthodes de séparation offraient une sélectivité suffisante pour les SN A, A1 et B après 20 à 24 min d'analyse^{135,138,140-142}.

9.2 Partie expérimentale

Pour cette méthode de séparation, la longueur finale et effective du capillaire ainsi que la température et le type de filtre utilisé ont été modifiés par rapport aux conditions générales données au deuxième chapitre. Pour le capillaire, une longueur totale de 64,6 cm et une longueur de 56 cm jusqu'au détecteur ont été sélectionnées. La température utilisée lors des analyses était de 23 °C à cause de la l'instabilité du SN A à de plus hautes températures^{135,140-142}. De plus, des filtres Spectrum de 0,45 µm de chez Spectrum

Laboratory ont plutôt été utilisés (Montréal, Canada). En effet, pour cette méthode d'analyse le taux d'adsorbance des SN sur les filtres Millex-FG de 0,2 μm a été déterminé. Cette étude paraissait importante dans ce contexte puisque les solutions à doser étaient très peu homogènes. Par les filtres Millex-FG, une adsorbance moyenne entre 8,0 et 8,5 % a été trouvée pour les SN, ce qui est grandement supérieure au 3 % d'adsorption maximale trouvée par les études comparatives présentées au deuxième chapitre^{41,42}. En filtrant 1 mL de la solution à analyser avec des filtres Spectrum, cette adsorption était de 2,3 à 3,6 %, ce qui mieux mais tout de même très près de la limite acceptable. Finalement, la méthode sélectionnée consistait à filtrer un plus grand volume (4 mL) avant de collecter la solution. Ainsi, il paraissait possible de saturer le filtre pour minimiser l'adsorption visible pendant l'analyse. Puisque l'adsorption était effectivement réduite de 0,1 à 1,6 %, cette méthode a alors été conservée.

La méthode de séparation finale développée pour ces analytes s'inspire des méthodes présentées par les groupes de Sheu et de Stuppner^{135,140-142}. Les paramètres qui ont été étudiés afin de maximiser la méthode étaient la nature du tampon (borate, borax, phosphate, glycine et carbonate), son pH (7,2 à 10,1) et sa force ionique (17 à 140 mM), le voltage (15 à 30 kV), le temps d'injection (1 à 7 s) et l'ajout d'additifs (10 à 20 mM de β -CD, de l'urée, 0-35 % d'ACN et 0 à 50 mM de SDS) en présence de l'AB comme étalon interne. La méthode maximisée devait ensuite être utilisée afin de tester la stabilité d'un échantillon dans le temps, selon la température ainsi que les effets de sa matrice afin de doser les six échantillons de produits naturels ainsi que le mélange de standard USP. Un choix d'étalon interne entre l'AB, l'Ibu, le 1,3-dihydroxynaphtalène, le purpurin et l'AAC a dû être fait pour réaliser ces étapes.

9.3 Résultats et discussion

Les trois premiers tampons utilisés étaient un tampon borax avec 10 % d'ACN, un tampon phosphate et un tampon acide borique avec 5 % de 1-propanol. Ils ont été testés en mode ÉCZ avec des pH variant entre 7,2 et 9,5. Une séparation complète des deux anions a été observée à l'aide des trois tampons en moins de 10 min. L'analyse de ce mélange de standards USP a aussi permis d'observer la présence en faible quantité d'une dizaine

d'impuretés (fig 9.2). Le tampon borax semblait toutefois être plus efficace puisqu'il isolait davantage les pics des principaux SN de ces impuretés. En utilisant le produit 1, la maximisation de la méthode a alors été effectuée. Le pH a été varié entre 9,3 et 10,1, la force ionique entre 17 et 139 mM et la proportion d'ACN entre 2,5 et 15,0 %. Par contre, en variant la quantité d'ACN dans le tampon borax, des irrégularités dans la ligne de base des électrophérogrammes ont été observées malgré un courant constant durant l'analyse. En effet, le tracé des électrophérogrammes devenait étrangement cyclique ou d'une forme sinusoïdale ou encore, il subissait des chutes temporaires non reproductibles d'une analyse à l'autre. Puisque les tests de qualification d'opération et de validation de performance (QO/PV) fonctionnaient bien, le problème ne pouvait provenir de l'instrument. Par contre, lorsque l'étalon du test QO/PV était analysé avec le tampon choisi pour les SN, cela ne donnait pas de bons résultats. L'utilisation d'autres tampons a donc été étudiée soit : acide formique/ammoniaque, borax sans ACN, carbonate, glycine ou acide borique. Le tampon qui a semblé le plus efficace pour effectuer la séparation était le tampon carbonate puisque aucune anomalie n'était visible et que le test de pureté du pic obtenu était de qualité supérieure.

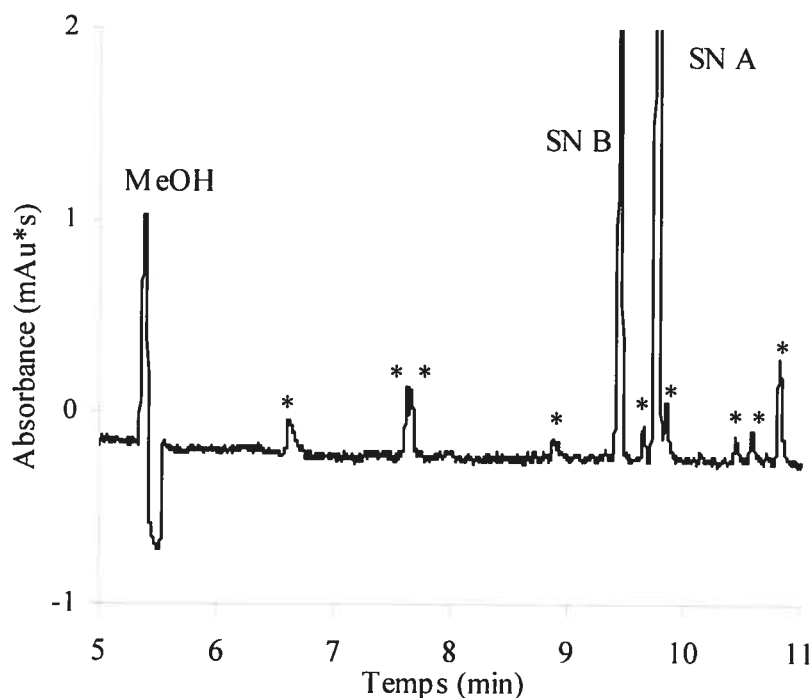


Figure 9.2 : Séparation des standards de sennosides ($c = 0,05$ mM) par ÉCZ. Tampon borax (pH 9,5, $I = 50$ mM), ACN 10 %; voltage 25 kV; injection 3 s (50 mbar). * Pics non identifiés.

La maximisation des nouveaux facteurs impliqués dans la méthode a alors été effectuée. Tel que constaté par le groupe de Stuppner¹³⁵, le pH et la quantité d'ACN ont effectivement été des facteurs importants pour la sélectivité de la séparation. Telle qu'illustrée à la figure 9.3, la sélectivité de la séparation était nettement supérieure à un pH plus élevé d'un intervalle variant entre 9,2 et 9,8. Un pH de 9,6 a été choisi parce que la qualité des électrophérogrammes obtenus était plus grande. Par la figure 9,3, il est aussi important de noter que les temps de migration de la plus importante impureté ont été rapportés puisque la présence de celle-ci avait une influence sur la sélectivité de la séparation. Par contre, sa représentation dans le graphique de l'influence du voltage sur l'efficacité n'était pas importante.

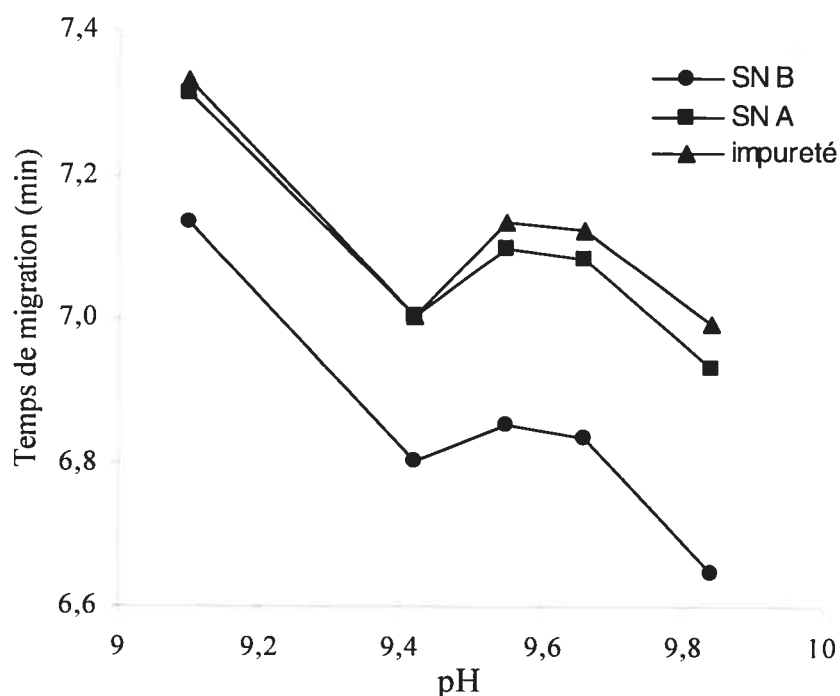


Figure 9.3 : Influence du pH de la solution tampon sur les temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. Tampon carbonate ($I = 80$ mM); voltage 25 kV; injection 3 s (50 mbar).

L'influence de la force ionique du tampon a ensuite été étudiée. Une variation de ce paramètre n'a pas une influence notable sur l'efficacité des analytes entre 48 et 92 mM mais une augmentation notable des temps de migration jusqu'à l'obtention d'un plateau à environ 80 mM a été observée pour des forces ioniques plus élevées (données non

présentées). Cette force ionique a tout de même été sélectionnée car elle offrait de meilleures résolutions et efficacités.

Puisque la résolution entre le pic du SN A et celui de l'impureté prédominante était encore insuffisante, des additifs ont été ajoutés individuellement afin de vérifier leurs effets sur la sélectivité de l'analyse. Les additifs testés étaient l'ACN, le SDS et la β -CD en présence d'urée. L'ajout d'une petite quantité de surfactant au tampon détériorait significativement la sélectivité obtenue. Une sélectivité suffisante a toutefois été obtenue dès l'ajout de 5 % d'ACN au tampon (voir figure 9.4). Le groupe de Stuppner¹³⁵ affirmait aussi qu'une sélectivité insuffisante entre le SN A1 et B était obtenue sans l'ajout d'un modificateur organique. Selon leurs études, les modificateurs les plus efficaces étaient dans l'ordre l'isopropanol, le *n*-propanol, l'EtOH, l'ACN et le MeOH. Une sélectivité maximale, sans perte de sensibilité, a été trouvée pour une proportion de 25 % en ACN avec un tampon de pH initial de 9,6. Cette sélectivité accrue pourrait être causée par le changement de pH du tampon et par l'altération des valeurs de pK_a des analytes dans ce mélange d'eau et d'ACN qui affecteraient leur mobilité effective¹⁴³. Par contre, les temps de migration augmentent d'autant plus puisque le FÉO est plus faible à cause de la constante diélectrique plus faible du mélange par rapport à celle de l'eau seule^{2,143-145}. De plus, l'ajout de β -CD et d'urée à diverses concentrations n'a pas permis d'améliorer la sélectivité de la méthode.

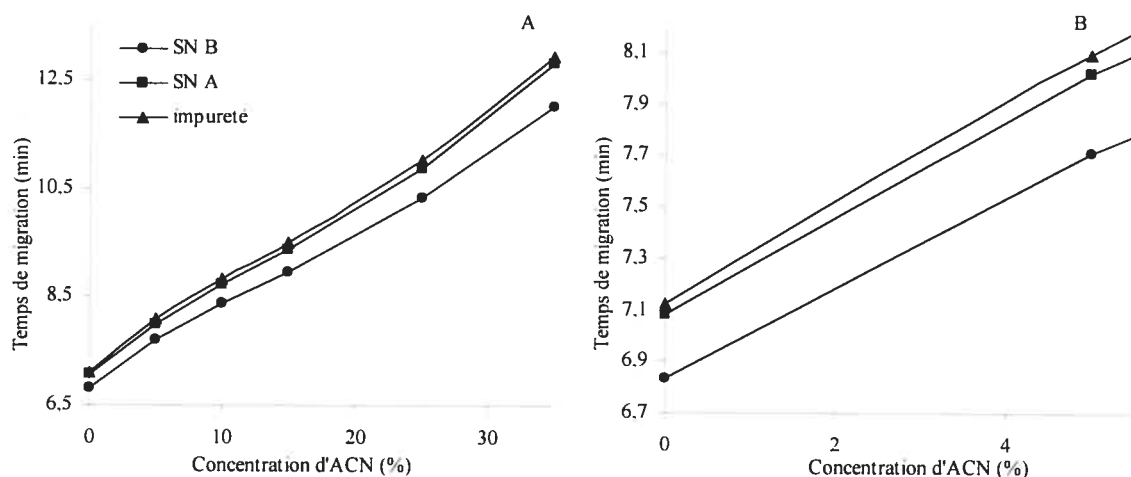


Figure 9.4 : Graphique A : Influence de la concentration d'ACN sur les temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. pH 9,6 ; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales. Graphique B : Agrandissement d'une section du graphique A.

Les effets du voltage et du temps d'injection ont aussi été investigués. À l'aide de la figure 9.5, il est possible de constater que le voltage appliqué pendant la séparation a une certaine importance pour l'efficacité des pics des SN. D'après les figures 9.5 et 9.6, une augmentation du voltage permet à la fois d'augmenter les efficacités des pics et de diminuer le temps d'analyse tel que souhaité. Un voltage de 25 kV a donc été sélectionné pour effectuer les analyses plus rapidement avec une meilleure incertitude par rapport aux voltages plus élevés. Le choix d'un temps d'injection entre 1 et 7 s a ensuite été effectué. Par cette étude, il a été constaté que dans tout cet intervalle, l'efficacité restait supérieur à 332 800. Un temps d'injection de 5 s (5,9 η L) a donc été sélectionné parce que la reproductibilité des aires des pics était meilleure.

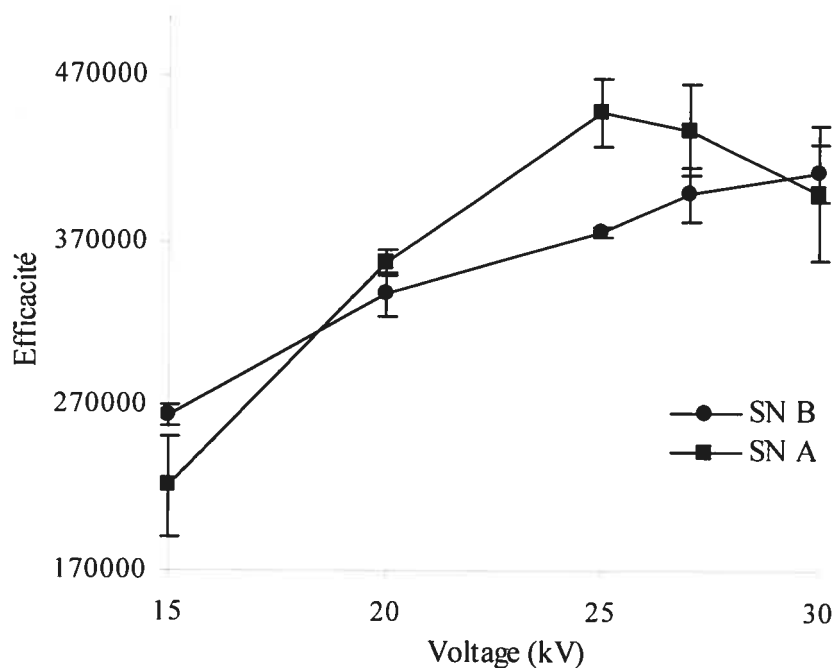


Figure 9.5 : Influence du voltage de séparation sur l'efficacité des sennosides. pH 9,6; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales.

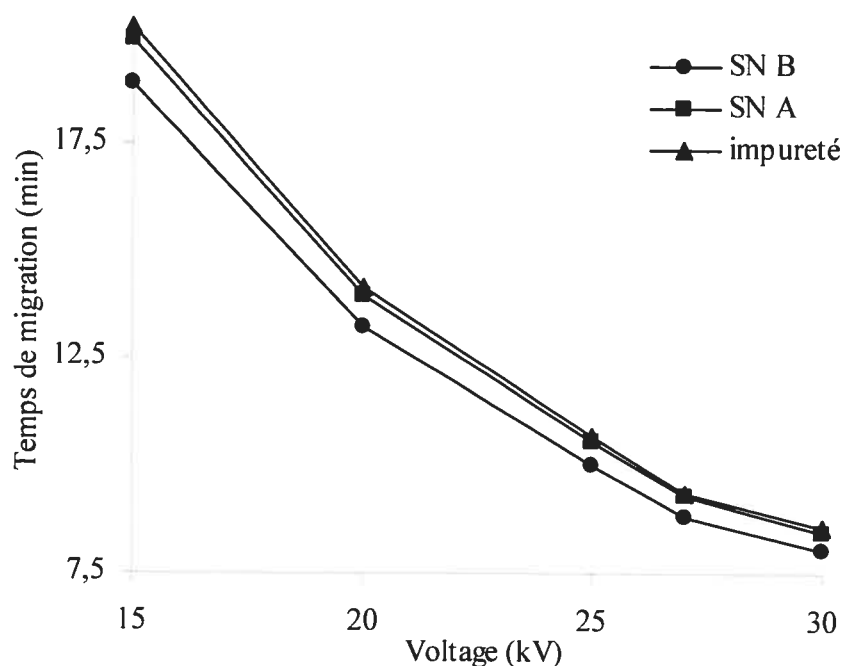


Figure 9.6 : Influence du voltage de séparation sur le temps de migration des sennosides et de l'impureté principale. pH 9,6; voir figure 9.3 pour les autres conditions expérimentales.

L'étalon interne a ensuite été sélectionné afin de réaliser l'étude de stabilité ainsi que le dosage des différents produits naturels. Le premier choix fut l'AB tel qu'utilisé par le groupe de Sheu¹⁴⁰. Par contre, l'aire de ce dernier diminuait grandement d'une injection à l'autre pour une efficacité autour de 130 000 selon une raison inconnue. Pour l'Ibu et le Napht, certains de leurs paramètres analytiques semblaient changer en présence ou non des SN. Quant au PP, il a été écarté parce qu'aucun pic n'était visible pour cet étalon en 20 min. L'ÉI final sélectionné fut l'AAC parce qu'en présence ou non des SN, il permettait d'obtenir une bonne reproductibilité avec une meilleure efficacité et un temps d'analyse plus court de cinq minutes.

Les conditions qui ont été fixées pour la méthode finale de séparation des SN en présence de l'ÉI sont disponibles dans le tableau IX.II. Un exemple d'électrophérogramme typique obtenu avec cette méthode est présenté à la figure 9.7. On peut y voir des fluctuations dans la ligne de base qui ne sont toutefois pas nuisibles à la séparation. Par cette figure, on peut aussi noter que le pic du FÉO a une forme différente de celle qui a été vue avec les méthodes réalisées précédemment. Il est possible que cette forme provienne de la présence combinée du MeOH et de l'ACN dans des proportions différentes.

Tableau IX.II : Conditions de séparation des sennosides.

Préconditionnement :	4 min tampon ; 2 min d'attente ; 3 min d'eau ; 4 min tampon		
Injection :	5 s à 50 mbar (5,9 η L)		
V / T / λ :	25 kV	23 °C	205 nm
Tampon :	NaHCO ₃ (35 mM) / Na ₂ CO ₃ (15 mM) pH 9,6 ; I = 80 mM ; ACN (25 %)		
Std c / matrice / marqueur :	c = 0,014 mM	62 % MeOH/eau ensuite dilué jusqu'à 21 % MeOH/eau	-

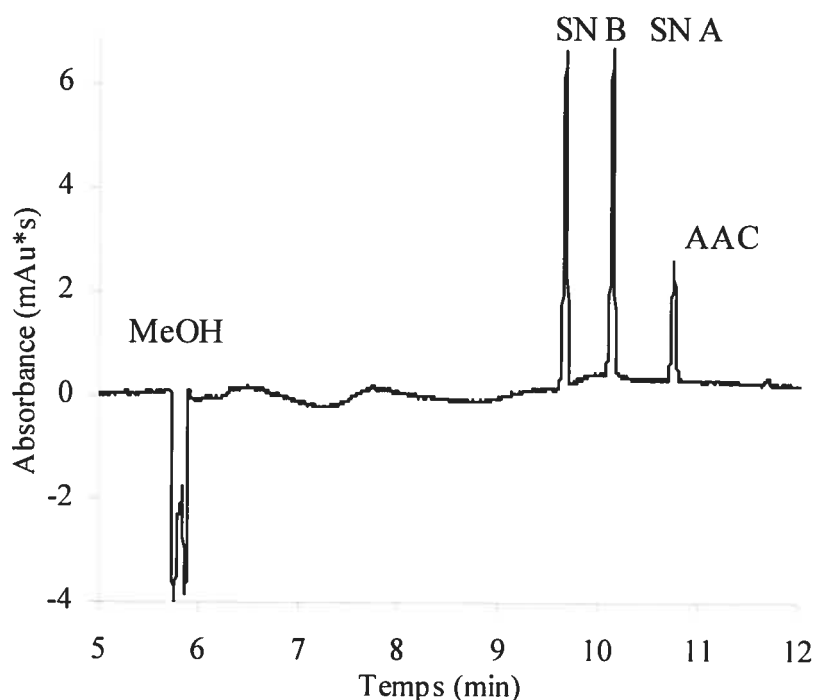


Figure 9.7 : Séparation des standards de sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ. Tampon carbonate (pH 9,6, $I = 80$ mM), ACN 25 %; voltage 25 kV; injection 5 s (50 mbar).

Les paramètres analytiques (voir tableau IX.III) de la méthode de séparation finale ont été déterminés de la manière habituelle avec un nombre de mesures de $N = 4$. La sensibilité obtenue pour la méthode est très bonne pour des domaines de linéarité de 0,002 à 0,02 mM dont les coefficients de corrélation sont entre 0,998 et 0,999. L'efficacité des pics est excellente et les résolutions sont suffisantes pour une méthode de 11 min. Les reproductibilités sont de 0,53 à 0,54 % pour les temps de migration et les mobilités apparentes, de 2,8 à 3,2 % pour l'aire et 2,4 à 2,7 % pour la hauteur des pics. Lorsque les

reproductibilités sont calculées par rapport à l'AAC, on trouve des valeurs de 0,04 à 0,07 %, de 0,26 à 0,54 % et de 0,55 à 0,81 % respectivement.

Tableau IX.III : Résultats analytiques pour la séparation des sennosides^a.

Composé	t_m (min)	$u_{app}(10^{-4})$ $cm^2V^{-1}s^{-1}$	H (mAu)	A (mAu*s)	R	N (10^5)	LD ^b (μM)	LQ ^c (μM)
SN B	9,75(5) ^d	2,47(1)	6,5(2)	15,2(4)	-	3,7(8)	1,7(4)	6(1)
SN A	10,22(5)	2,36(1)	6,4(2)	15,4(5)	7,0(3)	3,6(7)	1,7(4)	6(1)
AAC	10,83(6)	2,23(1)	2,33(6)	6,5(2)	8,3(3)	3,0(3)	0,5(1)	1,5(4)

^a $N = 4$; ^b $LD = 3 \times (DS/(dR/dC))$; ^c $LQ = 10 \times (DS/(dR/dC))$; ^d(s) : 9,75(5) = $9,75 \pm 0,05$

Les résultats de cinq méthodes tirées de la littérature^{135,138,140-142} ont pu être comparés aux résultats obtenus pour la présente méthode. Ces groupes^{135,138,140-142} obtenaient des reproductibilités de 0,6 à 6,0 %, des efficacités de 211 400 à 490 860 et des LD situées entre 0,7 et 42,0 μM à partir de courbes dont les coefficients de corrélation étaient de 0,999 à 1,000 pour des méthodes de 11 à 25 min. La méthode de séparation présentée dans le cadre de ce chapitre est donc avantageusement comparable à ces autres méthodes.

9.4 Stabilité

Une fois la méthode établie, des tests de stabilité ont alors pu être réalisés pour un produit sélectionné. La stabilité des composés analysés par cette méthode a été déterminée à partir de trois étapes différentes identifiées par A, B et C et dont les détails sont disponibles à l'annexe. Ces résultats ont été obtenus en comparant la hauteur de chacun des pics de SN par rapport à celle de l'étalon interne. La hauteur a été préférée à l'aire à cause de sa plus grande reproductibilité. Les résultats de l'étape A, qui consiste à vérifier la stabilité d'une solution de standards de SN A et B (Std 1) face à la température et dans le temps, sont présentés dans le tableau IX.IV. Le pourcentage comparatif d'une solution fraîche de standards de SN A et B (Std 2) à l'autre (Std 1) peut ainsi être considéré comme étant bon puisqu'il est en dessous d'une différence de 2,67 %. Cette valeur constitue toutefois la limite acceptable puisqu'elle est comparable au coefficient de variation maximum trouvé pour la hauteur de la méthode elle-même. Cette première étude a ainsi permis de confirmer que la solution standard demeure stable à température ambiante et lorsqu'elle est exposée à 60 °C pendant 1 h. Le pourcentage comparatif de la solution Std 1

est cependant altéré après 2 h à 60 °C. Cette altération plus importante pour le SN A pourrait être causée par son isomérisation (fig 9.8)⁵⁰.

Tableau IX.IV : Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape A de la mesure de stabilité^{a,c}.

SN	Std 2/Std 1	Std 1 96 h à T _{AMB}	Std 1 120 h à T _{AMB}	Std 1 168 h à T _{AMB}	Std 1 1 h à 60 °C	Std 1 2 h à 60 °C
B	99,7(2) ^b	99,9(4)	99(1)	101(1)	98,5(6)	101,3(3)
A	101,1(8)	100,3(8)	100(1)	101,3(7)	100,1(6)	104(2)

^a N = 2 ; ^b(s) : 99,7(2) = 99,7 ± 0,2 ; ^c Voir Annexe pour les détails expérimentaux.

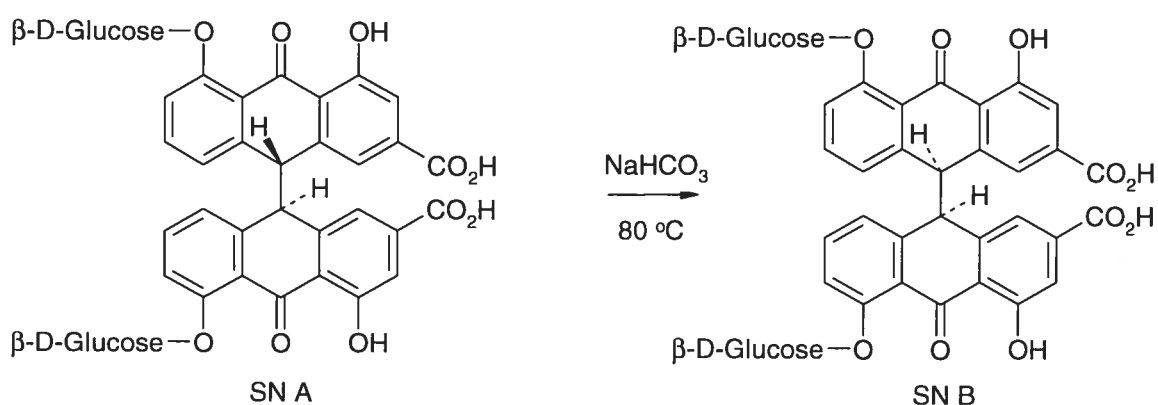


Figure 9.8 : Réaction d'isomérisation du SN A en SN B⁵⁰.

La deuxième étape de mesure de stabilité des SN pour cette méthode a été effectuée par rapport à un échantillon (produit 1) au lieu d'une solution de standards comme pour l'étape A. Il a été estimé que les cinq autres échantillons à analyser devraient démontrer un comportement semblable dans de mêmes circonstances. Deux solutions du produit 1 contenant les SN A et B ont été préparées dans les mêmes proportions et ont été nommé Éch 1 et 2. Les paramètres testés pour l'étape B (voir tableau IX.V) sont très similaires à ceux de l'étape A (voir tableau IX.V) mais des tests relatifs aux résidus ont aussi été ajoutés. Par cette étape, l'objectif visé était de vérifier l'influence de la matrice d'un échantillon pour une même quantité de SN par rapport à celle d'une solution de standards. D'après les résultats obtenus, on peut constater que la solution d'échantillon (Éch 1) est plus sensible à la température dans le temps que celles des standards puisque certaines incertitudes dépassent 2,67 %. Sa stabilité est tout de même acceptable à température ambiante mais la dilution au bain à ultrasons à température ambiante ne devait pas prendre

plus de 30 min car les SN seraient thermolabiles¹³⁹. Cette étude a aussi permis de déterminer que le pourcentage de SN restant dans les résidus des solutions Éch 1 et 2 se situait autour de 2,5%, ce qui est raisonnable puisque cette erreur est inférieure à celle de la méthode. En extrayant à nouveau les résidus des solutions dont les premiers résidus avaient déjà été extraits, aucune trace de SN n'a été trouvée et cela est indicatif de l'efficacité de la méthode de prétraitement. Un dernier point à noter pour l'étape B est que la mesure de précision entre les deux solutions d'échantillons (Éch 1 et 2) a été effectuée pour la somme des quantités de SN (SN A + B). En effet, ces quantités doivent être combinées puisque la proportion exacte de chaque SN n'était pas encore identifiée. Ce calcul est donc relatif puisqu'il est basé sur la quantité totale de SN présents dans l'échantillon selon le fabriquant.

Tableau IX.V : Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape B de la mesure de stabilité^{a,c}.

SN	Éch 2 /Éch 1	Éch 1 (168 h à T _{AMB})	Éch 1 (288 h à T _{AMB})	Éch 1 (1 h à 60 °C)	Éch 1 (2 h à 60 °C)	Résidu Éch 1	Résidu Éch 2
B	100(1) ^b	99(1)	100,3(4)	93(1)	94(1)	2,4(2)	2,5(4)
A		98,6(7)	99,7(7)	92(1)	93(1)	2,7(4)	2,8(1)

^a N = 2 ; ^b(s) : 100(1) = 100 ± 1 ; ^c Voir Annexe pour les détails expérimentaux.

La troisième et dernière étape de mesure de la stabilité est aussi reliée à la matrice de l'échantillon choisi. Tout comme pour l'étape B, un comportement similaire pour les six produits naturels a été supposé. Pour l'étape C (voir tableau IX.VI), d'autres effets de la matrice ont été déterminés en ajoutant une quantité connue de standard à une solution d'échantillon. En effet, deux solutions du produit 1 contenant les SN A et B ont été préparés dans les mêmes proportions qu'à l'étape B mais une quantité connue de standard USP (mélange de SN A et B) y a été ajoutée. Ces solutions d'échantillons ensemencées ont été nommées Ens 1 et 2. L'effet attendu de l'ensemencement des solutions de l'échantillon était que cela n'affecterait pas les paramètres calculés aux étapes précédentes. De plus, une comparaison acceptable devait être trouvée entre les étapes B et C lorsque la concentration des solutions Ens 1 et 2 serait ajustée à celle de l'étape B où les échantillons n'étaient pas ensemencés (Ens 1/Éch 1 et Ens 2/Éch 2). La conclusion trouvée pour cette étape est que cette méthode était suffisamment précise puisque le pourcentage comparatif entre les solutions Ens 1 et 2 est satisfaisant. De plus, en ajustant la concentration afin de comparer

ces résultats à ceux de l'étape B (vs Éch 1 et 2), on constate que les résultats sont satisfaisants. La stabilité dans le temps selon la température a aussi été testée pour un des échantillons ensemencés (voir tableau IX.VI). Les résultats semblent indiquer que ces effets sont légèrement moins importants à ce qui a été observé à l'étape B. Dans les conditions normales d'utilisation, la stabilité a été jugée comme étant suffisante puisqu'une variation inférieure à l'erreur sur la méthode elle-même a été trouvée.

Tableau IX.VI : Pourcentages comparatifs obtenus pour l'étape C de la mesure de stabilité^{a,c}.

SN	Ens 2/ Ens 1	Ens 1/ Éch 1	Ens 2/ Éch 2	Ens 1 (24 h à T _{AMB})	Ens 1 (120 h à T _{AMB})	Ens 1 (1 h à 60 °C)	Ens 1 (2 h à 60 °C)
B	100,1(9) ^b	101(1)	101(1)	101(1)	100,1(4)	99,1(4)	101,7(1)
A				100,7(5)	99(1)	101,7(2)	102(2)

^a N = 2 ; ^b(s) : 100,1(9) = 100,1 ± 0,9 ; ^c Voir Annexe pour les détails expérimentaux.

9.5 Dosage

Le dosage des six échantillons commerciaux et d'un standard USP a alors pu être effectué selon la méthode disponible à l'annexe. La quantité de SN présents dans chaque échantillon a été calculée en comparant la hauteur moyenne des pics de concentration connue en SN A et B dans le standard (Std 1) avec la hauteur moyenne des pics de l'échantillon. La deuxième solution standard (Std 2) a été injectée afin de déterminer la précision de la mesure du Std 1. Des injections intercalées d'un blanc ont aussi été ajoutées afin de prévenir des problèmes tels que l'apparition de pics fantômes puisque la matrice de ces échantillons était complexe. Tel que démontré dans le tableau IX.VII, la précision de ces mesures est suffisante par rapport à celle de la méthode utilisée. En effet, ces résultats ont un coefficient de variation inférieur à ceux trouvés pour la hauteur lors du test sur la méthode finalisée. À partir de ces résultats, il est intéressant de noter que les quantités de SN A et B trouvées d'un échantillon à l'autre sont très variables. De plus, certains de ces produits, comme le produit 4 dont le pourcentage comparatif est inférieur à 50 %, semblent être très peu conformes au dosage indiqué par le fabricant. De plus, la qualité du produit 6 ne peut pas être déterminée puisque le fabricant ne fournit pas d'indication relative au dosage de son produit. Ce point est d'autant plus important puisque l'ingrédient actif y est

présent en très faible quantité comparativement aux quantités trouvées chez les autres produits. Par contre, les effets de la matrice pourraient être à la source de ces différences vue la grandeur des incertitudes obtenues.

Tableau IX.VII : Dosage des sennosides A et B dans les produits naturels 1 à 6^{a,c}.

	1	2	3	4	5	6
Quantité attendue/Com (mg)	8,6	8,6	15	25	15	-
Quantité trouvée/Com (mg)	7,3(1) ^b	5,0(1)	11,7(3)	7,8(1)	12,1(2)	3,08(5)
Pourcentage comparatif (%)	85(2)	59(1)	78(2)	31,2(4)	81(1)	-
Coefficient de variation (%)	2,0	2,1	2,5	1,2	1,6	-
SN B/A (%)	107,9(1)	153(1)	117(1)	138,1(8)	144,8(2)	154,9(3)

^a $N = 6$; ^b(s) : $7,3(1) = 7,3 \pm 0,1$; ^c Voir Annexe pour les détails expérimentaux.

Les électrophérogrammes des différents produits naturels analysés sont disponibles dans les figures 9.9 à 9.14. D'après l'apparence générale des électrophérogrammes, on constate, qu'en plus de contenir des quantités totales additionnées en SN A et B qui sont différentes, le rapport entre les deux SN n'est pas toujours le même (% SN B/A). En effet, malgré le fait le SN B soit dominant en quantité pour les six produits, ces rapports varient entre 108 et 155 %. En observant les divers électrophérogrammes, il est aussi possible de noter que certaines impuretés semblent être plus dominantes et récurrentes, principalement celles avec les temps de migration de 7,9 (possiblement le SN C, D ou D1) et 10,7 (probablement le SN A1¹³⁵) min.

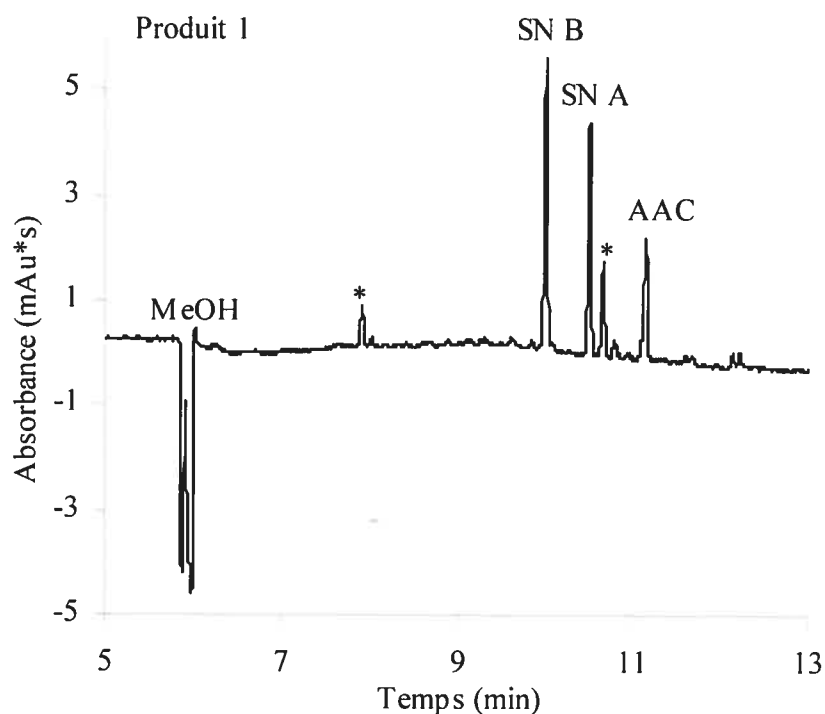


Figure 9.9 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 1. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

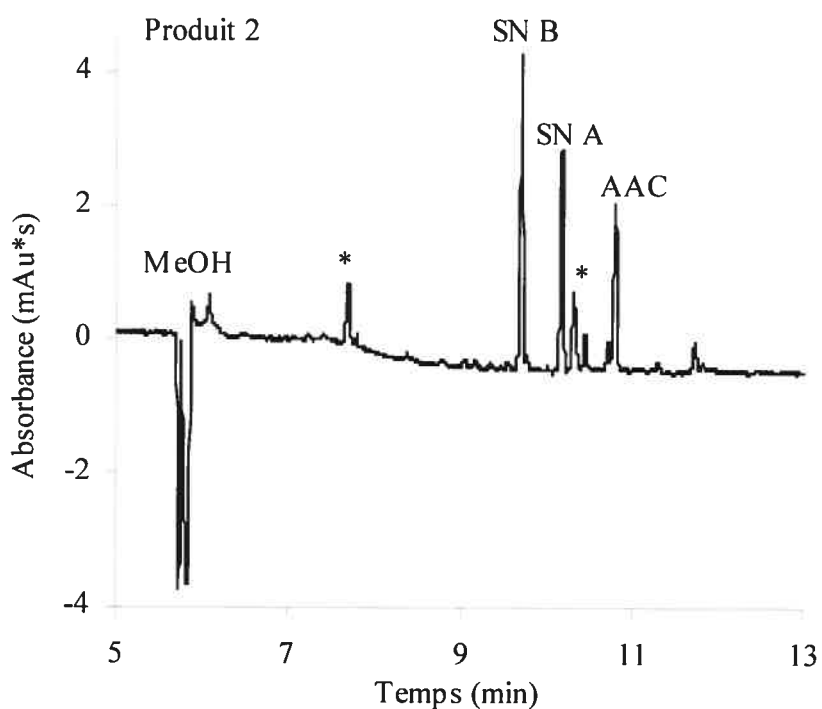


Figure 9.10 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 2. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

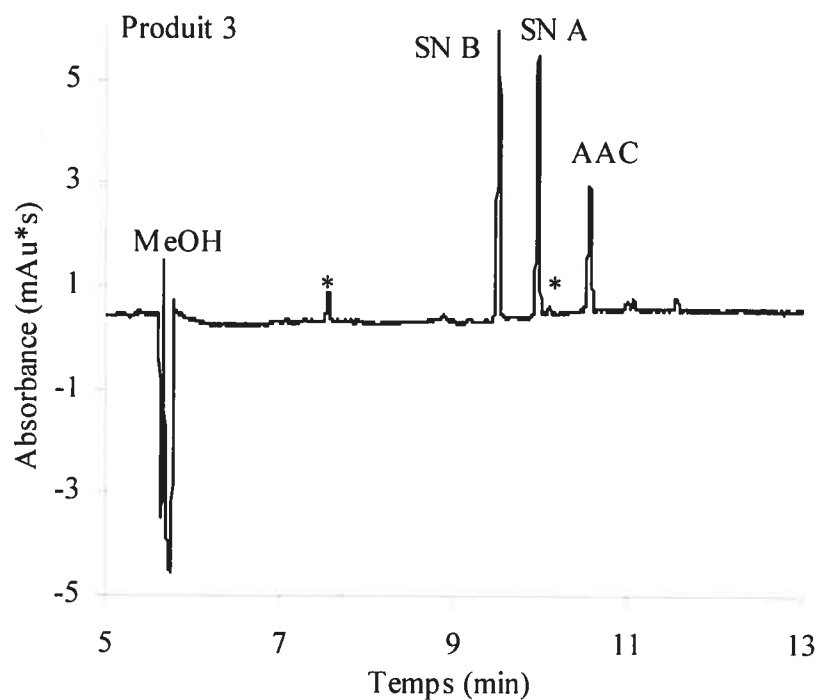


Figure 9.11 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 3. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

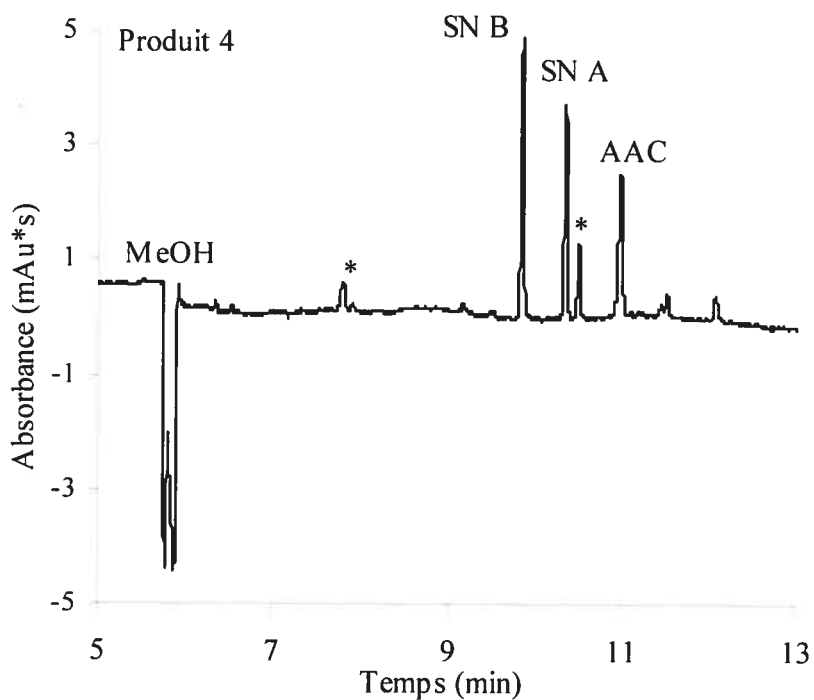


Figure 9.12 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 4. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

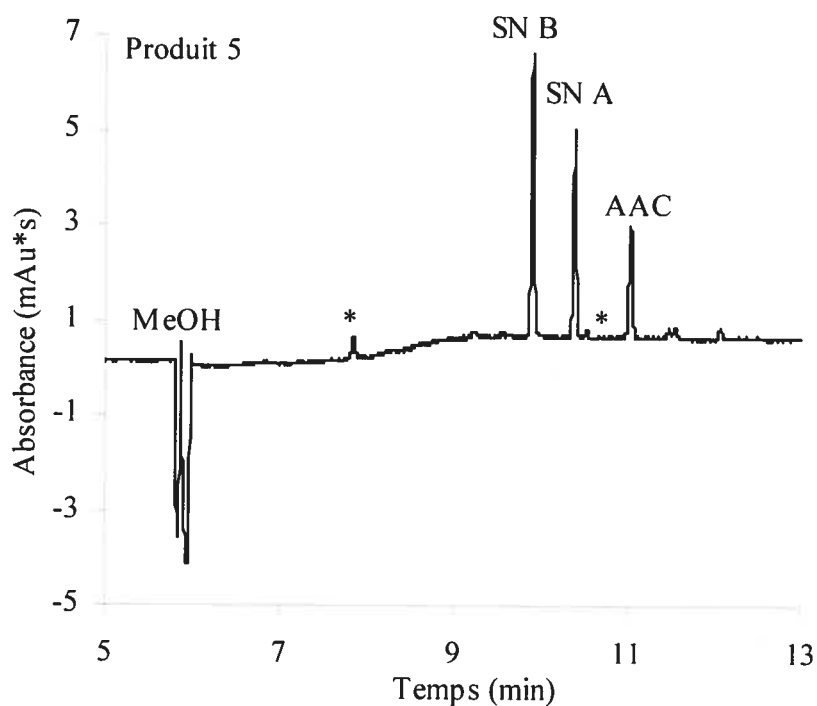


Figure 9.13 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 5. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

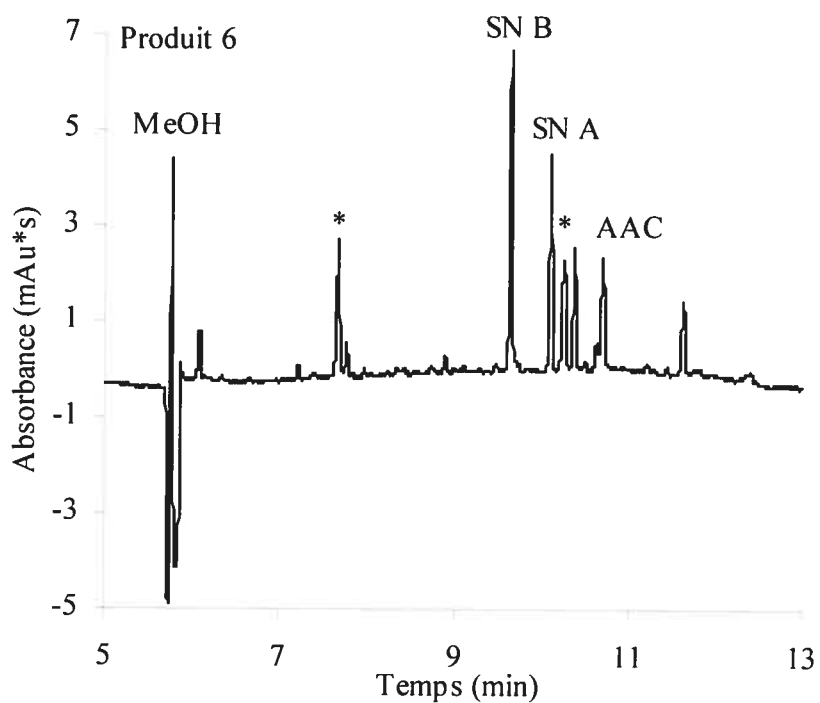


Figure 9.14 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le produit 6. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

Les observations générales effectuées à partir des électrophérogrammes peuvent être expliquées par le fait que ces produits peuvent provenir de l'une des deux espèces de *Cassia*^{134,135,146}. En effet, un parallèle entre les quantités de SN, trouvées par le groupe de Stuppner et de Grimminger^{135,146}, chez les deux espèces peut être fait à partir des pourcentages comparatifs, des impuretés principales et des proportions de SN B et A des six produits (voir tableau IX.VIII). En effet, pour les racines et les feuilles de l'espèce *C. angustifolia* le rapport SN B/A est plus élevé similairement à ceux trouvés pour les produits 2, 5 et 6. Puisque la méthode de purification ou de séchage aurait pu affecter la quantité trouvée dans le produit 5 (144,8 %), ce parallèle est moins applicable pour ce dernier comparativement aux produits 2 et 6 (153 et 157 %)¹³⁶. Une hypothèse semblable ne peut être appliquée pour le produit 1 puisqu'on observe à la fois un rapport de proportion nettement plus faible (107,9 %) et un nombre plus élevé d'impuretés. Pour le produit 4, un parallèle peut être fait avec les racines de *C. acutifolia* puisque les rapports SN B/A sont similaires (138,1 vs 124 %). Comme pour le produit 5, le produit 3 possède un nombre définitivement inférieur d'impuretés et un rapport de proportion légèrement plus faible de 117 %. Par contre, ces observations ne peuvent pas être considérées comme des conclusions définitives puisque les sources de ces produits ne sont pas disponibles.

Tableau IX.VIII : Proportions moyennes des sennosides d'intérêt dans les espèces de *Cassia* et de *Rhei Rhizoma* mesurées par EC et par CLHP^{a135,138,146}.

	<i>C. angustifolia</i>		<i>C. acutifolia</i>	<i>Rhei Rhizoma</i>
	Feuilles	Racines	Racines	-
SN A (%)	24(2) ^b	28(2)	34(2)	38(10)
SN B (%)	37(3)	46(4)	42(3)	21(10)
SN A1 (%)	7,7(5)	11(2)	10,0(1)	-
Σ A, B (%)	61(2)	74(6)	76(4)	58(10)
SN B/A (%)	153(20)	163(1)	124(3)	55(10)

^a N = 6 ; ^b(s) : 24(2) = 24 ± 2

Un autre point notable par rapport aux données sur les deux espèces de *Cassia* est que la majorité des pourcentages comparatifs trouvés pour les SN A et B sont très similaires aux proportions des SN A et B présents chez ces deux espèces (59 à 85 % vs 61 à 76 %)^{135,138,146}. Les proportions individuelles de SN A et de SN B étaient calculées par rapport à la quantité totale de SN (A, B, A1, C, etc.) et d'autres produits reliés^{135,146}. Les fabricants des six produits naturels donnaient généralement (le fabricant du produit 4 ne rapportait que

la quantité de SN A et B alors qu'aucune mesure n'était disponible pour le produit 6) les quantités d'ingrédients actifs en terme de SN USP ou standardisés et non de SN A et B. Ce peut être une explication possible pour certains des faibles pourcentages comparatifs obtenus. L'identification officielle des différentes impuretés potentiellement nocives (aloe-émodin et émodin)¹⁴⁶ présentes dans chacun des produits devrait être effectuée ultérieurement.

Le dosage de la solution contenant des SN USP (voir tableau IX.IX et figure 9.15) a aussi été réalisé en plus des six premiers dosages. Ce produit est un standard dont la quantité présente a été dosée selon des normes rigoureuses. Selon USP, il contient 0,962 mg de SN (A, B, C, etc.) par mg de poudre sans toutefois indiquer le dosage exact en SN A et B qui devraient toutefois être les constituants majoritaires du standard. De plus, d'autres sennosides et produits dérivés sont aussi présents. Le dosage de l'eau dans ce standard a été effectué à l'aide d'un titrage Karl Fischer puisqu'il semblait être très hygroscopique. Au moment de son dosage, une teneur en eau de 6 % dans le standard USP a été trouvée. Si l'on ne considère pas la présence d'impuretés dans la solution, le pourcentage comparatif trouvé pour les SN A et B est donc de 74 % avec une reproductibilité comparable à celle trouvée précédemment. Par contre, lorsque l'on considère dans le pourcentage comparatif que toutes les impuretés visibles sont des SN ou des produits liés, il augmente alors de 12 %. Un écart de 10,2 % par rapport à la valeur attendue de 96,2 % est trouvé. Une meilleure comparaison aurait été obtenue si les quantités en SN A et B avaient été connues précisément. Ainsi, une idée générale de la fiabilité des résultats pour l'ensemble des dosages en aurait résultée puisque ces produits naturels ne sont pas réglementés.

Tableau IX.IX : Dosage des sennosides A et B dans le standard USP^{a,c}.

	SN A et B	SN A, B et impuretés
Quantité attendue/10,10(4) mg (mg)	9,13(4) ^b	9,13(4)
Quantité trouvée/10,10(4) mg (mg)	6,7(2)	7,9(2)
Pourcentage comparatif (%)	74(2)	86(2)
Coefficient de variation (%)	2,4	2,0
SN B/A (%)	43,9(3)	-

^a N = 6 ; ; ^b(s) : 9,13(4) = 9,13 ± 0,04 ; ^c Voir Annexe pour les détails expérimentaux.

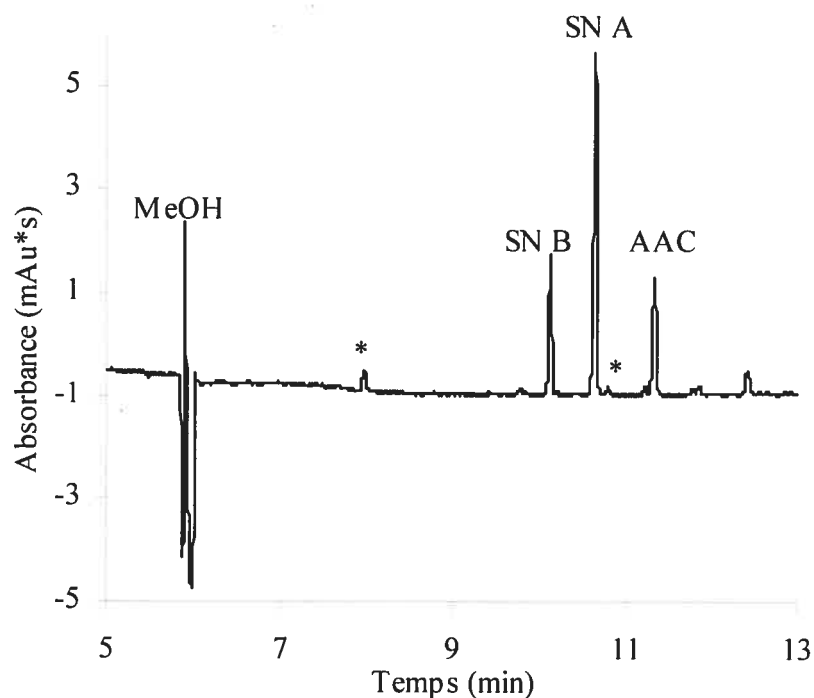


Figure 9.15 : Dosage des sennosides ($c = 0,01$ mM) par ÉCZ pour le standard USP. Voir figure 9.7 pour les conditions expérimentales. * Pics non identifiés.

Le rapport SN B/A a aussi été mis en évidence pour le standard USP. Il est possible de constater une inversion de sa proportion (43,9 %) comparativement à celles des six autres produits et aux résultats obtenus pour les deux espèces de *Cassia*^{135-137,146}. Cette inversion concorde (43,9 vs 55 %)¹³⁸ avec les résultats des groupes de Sheu et Oshima^{138,140-142,147,148} obtenus à partir d'extraits de rhubarbe (*Rhei Rhizoma*).

9.6 Conclusion

La méthode de séparation qui a été développée pour les SN est suffisamment performante du point de vue de sa sélectivité, de son efficacité, de sa sensibilité et de sa stabilité. Les dosages des SN A et B de six produits naturels commerciaux et d'un standard USP ont ainsi pu être réalisés avec une précision satisfaisante. Les faibles pourcentages comparatifs obtenus par rapport aux quantités rapportées par les fabricants semblent indiquer que ces produits, élaborés à partir de feuilles et de racines de *Cassia*, auraient peut-être intérêt à être réglementés afin d'assurer le respect de certaines normes de qualité.

10. CONCLUSION ET DÉVELOPPEMENTS FUTURS

Les diverses familles de composés pharmaceutiques qui ont été présentées au cours de ce mémoire ont tous été séparées par des méthodes d'ÉC distinctes comme le ÉCZ, le ÉCÉM, l'ÉCÉ et le CD-ÉCÉ en employant divers tampons, surfactants, cyclodextrines et autres additifs. Le développement d'une seule méthode de séparation générale pour l'ensemble des analytes telle que celle présentée par le groupe d'Altria¹¹⁰ aurait été expérimentalement très pratique. Par contre, les méthodes développées sont suffisamment bonnes pour être utilisées telles quelles. En effet, les séparations maximisées de barbituriques, d'antiviraux, de tétracyclinoïdes, de pénicillines, d'analgésiques, des énantiomères du valsartan et de sennosides peuvent, de manière générale, être considérées comme étant satisfaisantes d'après les valeurs obtenues pour les paramètres analytiques appropriés. Les méthodes de séparation du valsartan et de sennosides ont d'ailleurs permis d'effectuer la quantification de véritables échantillons commerciaux pour Santé Canada. Il serait pertinent de vérifier les interactions des constituants des comprimés pour les autres familles de composés en vue de leur quantification.

Il serait aussi pertinent de développer de telles méthodes de séparation pour d'autres familles de composés dont les antihistaminiques, les opiacées, les benzodiazépines, etc. De plus, certaines de ces méthodes pourraient se prêter à l'utilisation d'un SM comme détecteur. Son couplage avec l'ÉC pourrait augmenter significativement la sensibilité des analyses en plus de faciliter grandement l'identification de produits de dégradation et d'impuretés qui sont potentiellement toxiques et/ou réglementés.

11. RÉFÉRENCES

1. M. Taverna, A. Baillet, D. Baylocq-Ferrier, *Ann. pharmaceutiques françaises* 50 (1992) 199.
2. D. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis - An Introduction*, Agilent Technologies, Germany (2000).
3. D. C. Harris, W.H. Freeman and Company, *Quantitative Chemical Analysis*, 5e édition, New York (1998) 769.
4. C.A. Lucy, R.S. Underhill, *Anal. Chem.* 68 (1996), 300.
5. F. Rouessac, A. Rouessac, *Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes*, 4e édition, Dunod, Paris (1998) 101.
6. J.W. Jorgenson, K.D.A. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
7. J.R. Mazzeo, M.E. Swartz, E.R. Grover, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2966.
8. S.E. Geldart, P.R. Brown, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 317.
9. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 113.
10. E. Fuguet, C. Ràfois, E. Bosch, M. Rosés, *Electrophoresis* 23 (2002) 56.
11. M.F. Renou-Gonnord, K. David, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 249.
12. C.-X. Zhang, W. Thormann, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 157.
13. C.A. Monnig, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 66 (1994) 280R.
14. R. Vespalec, P. Bocke, *Chem. Rev.* 100 (2000) 3715.
15. M.M. Dittmann, G.P. Rozing, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 63.
16. H. Cottet, M.P. Struijk, J.L.J. Van Dongen, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 915 (2001) 241.
17. M. Szulc, I.S. Krull, *J. Chromatogr. A* 659 (1994) 231.
18. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Chimie analytique*, DeBoeck Université, 7e édition, Paris (1997).
19. J.S. Green, J.W. Jorgenson, *J. Liq. Chromatogr.* 12 (1989) 2527.
20. T. Tsuda, J.V. Sweedler, R.N. Zare, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2149.
21. M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp, S. Moring, *Anal. Chem.* 63 (1991) 417.
22. R.D. Smitt, J.H. Wahl, D.R. Goodlett, S.A. Hofstadler, *Anal. Chem.* 65 (1993) 574A.
23. S.C. Smith, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 57.
24. *A Quick Start Guide to Capillary Electrophoresis*, CE Method Optimization, Agilent Technologies, Germany (2000).
25. I. Béchet, M. Fillet, Ph. Hubert, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 497.
26. Y. Hayashi, R. Matsuda, M. Ishikawa, *Am. Biotech. Lab.* 20 (2002) 20.
27. H. Wätzig, *J. Chromatogr. A* 700 (1995) 1.
28. T.C. Paino, A.D. Moore, *Pharm. Technol.* 23 (1999) 86.
29. B. Proksa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 179.
30. D.D. Perin, Boyd Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall Ltd, Laboratory manual, London (1974).
31. *USP : NF The official Compendia of Standards 2004*, United States Pharmacopeia Conception, Rockville (2004).
32. R. Beynon, *Buffer for pH Control*, Buffer Calculator, <http://www.bi.umist.ac.uk/users/mjfrbn/buffers/makebuf.asp>, University of Liverpool, Liverpool, (2003-2005).

33. S. Srijaranai, R. Burakham, T. Khammeng, R.L. Deming, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 145.
34. *Agilent capillary electrophoresis system User's guide*, Germany (2000).
35. *CE Partner The comprehensive, interactive tool for users of CE*, Agilent Technologies (2000).
36. W.J. Lambert, D.L. Middleton, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1585.
37. K. Persson-Stubberud, O. Åström, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 95.
38. H. Corstiens, H.A.H. Billiet, J. Frank, K.C.A.M. Luyben, *Electrophoresis* 17 (1996) 137.
39. D.K. Lloyd, H. Wätzig, *J. Chromatogr. B* 663 (1995) 400.
40. B. Fan, J.T. Stewart, *J. Liq Chromatogr. Related Technol.* 25 (2002) 241.
41. J.M. Johnson, C.H. Harris, *J. Chromatogr. Sci.* 25 (1987) 267.
42. J.W. Munson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 4 (1986) 717.
43. D.C. Delinsky, K. Srinivasan, H. M. Solomon, M.G. Bartlett, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 25 (2002) 113.
44. W. Thormann, P. Meier, C. Marcolli, F. Binder, *J. Chromatogr.* 545 (1991) 445.
45. M.S. Berner, P. Biron, G.N. Rotenberg, *Le guide pratique des médicaments*, 1e édition, Association médicale canadienne, Reader's Digest Association, Montréal (1990).
46. S. Loeb, G.R. Spratto, *Précis de pharmacologie*, Édition du renouveau pédagogique, Ottawa (1987).
47. *Les drogues Faits et Méfaits*, Division de la Stratégie canadienne antidrogue, Santé Canada, Ottawa (2000).
48. C.M. Boone, J.-P. Franke, R.A. de Zeeuw, K. Ensing, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 259.
49. United Nations, Office on drugs and crime, *The barbituric acids, their chemical structure, synthesis and nomenclature*, http://www.unodc.org/unodc/bulletin/bulletin_1957-01-01_1_page004.html, Vienna, (2006).
50. M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, J. R. Obenchain Jr., J. A. R. Gallipeau, M. A. D'Arecca, S. Budavari, *The Merck index*, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 13e édition, Merck and co. (2001).
51. S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1217.
52. F. Guan, H. Wu, Y. Luo, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 133.
53. Santé Canada, *Maladies et Affections*, <http://www.hc-sc.gc.ca/francais/maladies/sida.html>, Ottawa (2005).
54. S. Ege, *Organic chemistry, Structure and reactivity*, 4e édition, Houghton Mifflin Compagny, Boston (1999) 896.
55. X. Cahours, P. Morin, H. Dessans, L.A. Agrofoglio, *Electrophoresis* 23 (2002) 88.
56. D.L. Walters, D.L. Jacobs, J.E. Tomaszewski, S. Graves, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 955.
57. E.N. Fung, Z. Cai, T.C. Burnette, A.K. Sinhababu, *J. Chromatogr. B* 754 (2001) 285.
58. K.J. Doshi, J.M. gallo, F.D. Boudinot, R.F. Schinazi, C.K. Chu, *Drug Metab. Dispo.* 17 (1989) 590.
59. T. Nadal, J. Ortuño, J.A. Pascual, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 127.
60. R.P. Singhal, D. Hughbanks, J. Xian, *J. Chromatogr.* 609 (1992) 147.
61. J. Bloom, J. Ortiz, J.F. Rodríguez, *Cell. Mol. Biol.* 43 (1997) 1051.
62. A.S. Cohen, S. Terabe, J.A. Smith, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1021.

63. G. Balyiannis, D. Papaioannou, N.K. Karamanos, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 271.
64. X. Cahours, H. Dessans, P. Morin, M. Dreux, L.A. Agrofoglio, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 101.
65. H. Nishi, T. Fukayama, M. Matsuo, S. Terabe, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 519.
66. M.E. Swartz, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 923.
67. Agence de santé publique du Canada, *Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA)*, Rapport 2002, http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/index_f.html, Ottawa (2005).
68. S. Croubels, W. Baeyens, C. Dewaele, C. Van Peteghem, *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 267.
69. M.F.M. Tavares, V.L. McGuffin, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 129.
70. C.-X. Zhang, Z.-P. Sun, D.-K. Ling, Y.-J. Zhang, *J. Chromatogr.* 627 (1992) 281.
71. J.H. Knox, J. Jurand, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 763.
72. A. Aszalos, C. Haneke, M.J. Hayden, J. Crawford, *Chromatographia* 15 (1982) 367.
73. N.H. Khan, E. Roets, J. Hoogmartens, H. Vanderhaeghe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 339.
74. K. Tsuji, J.F. Goetz, *J. Antibiot.* 31 (1978) 302.
75. S.K. Yeo, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.* 585 (1991) 133.
76. S. Tanase, H. Tsuchiya, J. Yao, S. Ohmoto, N. Takagi, S. Yoshida, *J. Chromatogr. B* 706 (1998) 279.
77. T. Hassan, B.S. Cooperman, *J. Chromatogr.* 321 (1985) 462.
78. A. Van Schepdael, J. Saevels, X. Lepoudre, R. Kibaya, N. Z. Gang, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 695.
79. R. Capote, J. Diana, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 399.
80. J. Neužil, J. Novotná, I. Vančurová, V. Běhal, Z. Hošťálek, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 2789.
81. I.P. Kaniou, G.A. Zachariadis, J.A. Stratis, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 2891.
82. W.J.J. Krauwinkel, N.J. Volkers-Kramermans, *J. Chromatogr. B* 679 (1996) 129.
83. M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 97.
84. J.M. Blaha, A.M. Knevel, S.L. Hem, *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 1384.
85. H.B. Seth, V.A. Yaylayan, N.H. Low, M.E. Stiles, P. Sporns, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 1125.
86. A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, H. Vanderhaeghe, *J. Chromatogr.* 370 (1986) 149.
87. P.A. Twomey, *J. Pharm. Sci.* 70 (1981) 824.
88. I. Ghebre-Sellassie, S.L. Hem, A.M. Knevel, *J. Pharm. Sci.* 71 (1982) 351.
89. A.A. Khier, G. Blaschke, M. El Sadek, *Anal. Lett.* 17 (1984) 1659.
90. W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.
91. J. Martín, R. Méndez, A. Negro, *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 1707.
92. A.J. Shah, M.W. Adlard, G. Holt, *Analyst* 113 (1988) 1197.
93. W.A. Vadino, E.T. Sugita, R.L. Schnaare, H.Y. Ando, P.J. Niebergall, *J. Pharm. Sci.* 68 (1979) 1316.
94. H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, S. Terabe, *J. Chromatogr.* 477 (1989) 259.
95. H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 245.
96. S.S. Yang, R.K. Glipin, *J. Chromatogr. Sci.* 26 (1988) 416.
97. B.R. Thomas, X.G. Fang, P. Shen, S. Ghodbane, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 85.

98. M.G. Donato, E. Van den Eeckhout, W. Van den Bossche, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 197.
99. F. Welder, C.L. Colyer, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 1525.
100. M.S. Aurora-Prado, M. Steppe, M.F.M. Tavares, E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 333.
101. M. Fillet, I. Bechet, V. Piette, J. Crommen, *Electrophoresis* 20 (1999) 1907.
102. L. Suntornsuk, *Electrophoresis* 22 (2001) 139.
103. S. Terabe, K. Otsuka, H. Nishi, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 295.
104. K. Persson-Stubberud, O. Åström, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 307.
105. *Sigma-Aldrich catalogue*, Sigma-Aldrich Canada Lté, Oakville (2000-2001).
106. S. Fujiwara, S. Honda, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2773.
107. C.-X. Zhang, F. von Heeren, W. Thornmann, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2070.
108. Y. Takana, Y. Kishimoto, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 49.
109. W. Ahler, W. Buchberger, *Am. Lab.* 33 (2001) 31.
110. K.D. Altria, R. McLean, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 807.
111. M. Tomita, T. Okuyama, *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 273.
112. *Directive de la direction des médicaments, Méthodes Acceptables*, Santé Canada, Ottawa, 1994.
113. C. Quang, M.G. Khaledi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3354.
114. S.A.C. Wren, *J. Chromatogr.* 636 (1993) 57.
115. W. Lindner, B. Bohs, V. Seidel, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 549.
116. P.D. Ferguson, D.M. Goodall, J.S. Loran, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 25.
117. Y.L. Loukas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997) 275.
118. Y. Walbroehl, J. Wagner, *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 321.
119. G. Schill, I.W. Wainer, S.A. Barkan, *J. Chromatogr.* 365 (1986) 73.
120. Y.Y. Rawjee, R.L. Williams, G. Vigh, *J. Chromatogr. A* 652 (1993) 233.
121. C. Vogt, S. Kiessig, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 53.
122. A. Aumatell, R.J. Wells, D.K.Y. Wong, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 293.
123. L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez, *Chromatographia* 52 (2000) 735.
124. S. Hillaert, W. Van den Bossche, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 323.
125. S. Hillaert, T.R.M. De Beer, J.O. De Beer, W. Van den Bossche, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 125.
126. L. González, U. Akesolo, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, *Electrophoresis* 23 (2002) 233.
127. R.C. Williams, M.S. Alasandro, V.L. Fasone, R.J. Boucher, J.F. Edwards, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1539.
128. B.R. Thomas, X.G. Fang, X. Chen, R.J. Tyrrell, S. Ghodbane, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 383.
129. S. Hillaert, W. Van den Bossche, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 329.
130. S. Hillaert, K. De Grauwe, W. Van den Bossche, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 439.
131. M.I. Maguregui, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, *J. Chromatogr. Sci.* 36 (1998) 516.
132. A. Aumatell, R.J. Wells, *J. Pharm. Sci.* 31 (1993) 502.
133. J. Li, K.C. Waldron, *Electrophoresis* 20 (1999) 171.
134. W. Metzger, K. Reif, *J. Chromatogr. A* 740 (1996) 133.
135. H. Stuppner, S. Sturm, *Chromatographia* 42 (1996) 697.
136. F. Muffat, Ph. Bernard, J.F. Sabot, *J. Chromatogr.* 369 (1986) 261.
137. S.-W. Sun, H.-T. Su, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 881.
138. S.-J. Sheu, H.-R. Chen, *Anal. Chim. Acta* 309 (1995) 361.

139. W. Liao, K. Chiu, C. Mabuni, M. Soliman, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61 (1998) 317.
140. W.-C. Weng, S.-J. Sheu, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 143.
141. S.-J. Sheu, C.-F. Lu, *J. High Resolut. Chromatogr.* 19 (1996) 409.
142. S.-J. Sheu, C.-F. Lu, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 269.
143. S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Chromatographia* 53 (2001) 290.
144. M.-L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valkó, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155.
145. C. Schwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801.
146. W. Grimminger, K. Witthohn, *Pharmacology* 47 (1993) 98.
147. K. Sagara, T. Oshima, T. Yoshida, *J. Chromatogr.* 403 (1987) 253.
148. S.-J. Sheu, C.-F. Lu, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 518.

ANNEXE

Procédures utilisées afin de tester la stabilité des sennosides A et B (SN A et B) dans des solutions de standards, d'un échantillon de produit naturel de sennosides et d'un échantillon ensemencé en trois étapes.

Informations générales applicables aux étapes A, B et C :

La matrice de type 1 (M1) ou solution mère est constituée de 0,041 mM de l'étalon interne (ÉI) dans 62 % MeOH/eau. L'ÉI est l'acide anthraquinone-2-carboxylique (AAC). Cette solution est faite en très grande quantité afin d'être utilisée tout au long des différentes étapes. Cela permet de conserver une concentration stable en AAC. La matrice de type 2 (M2) ou matrice finale contient une concentration de 0,014 mM en AAC dans 21 % MeOH/eau. Chacune des solutions effectuées dans les différentes étapes est injectées en duplicata à moins d'indications contraires.

Étape A :

L'étape A consiste à tester la stabilité de solutions de standards de SN dans le temps et avec la température. Deux solutions identiques (Std 1 et Std 2) sont faites à partir des standards isolés des SN A et SN B de Fluka pour une concentration de 0.041 M de chaque SN dans la M1. Les solutions sont agitées 30 minutes au sonicateur. Ensuite, elles sont diluées avec de l'eau afin d'obtenir les solutions finales M2 de concentration de 0,014 mM pour chaque sennoside. Cette concentration est celle de la méthode développée. Afin de vérifier l'influence du temps, ces solutions sont injectées immédiatement ainsi qu'après 96, 120 et 168 heures aux conditions ambiantes. Afin de vérifier l'influence de la température sur la solution Std 1, deux portions appelées solutions A et B sont laissées respectivement une et deux heures au bain-marie à 60 °C.

Étape B :

L'étape B consiste à tester la stabilité de solutions d'un échantillon commercial (produit 1) de SN dans le temps et avec la température. Deux solutions identiques de M1 sont préparées à partir du produit 1. Elles sont agitées puis diluées avec de l'eau afin d'obtenir la M2. Ces solutions sont centrifugées pendant 10 minutes, décantées puis transférées complètement dans d'autres contenants afin de pouvoir analyser les résidus insolubles. Ensuite, une portion de chaque solution de SN est diluée avec la M2 afin d'ajuster la concentration des SN par rapport à l'étape A. Pour ces solutions appelées Éch 1 et 2, des essais dans le temps (immédiatement, 168 h et 288 h) et par rapport à la température sont aussi effectués.

Analyse des résidus a et b des solutions Éch 1 et 2 :

Aux résidus insolubles des solutions Éch 1 et 2 restant dans la fiole conique de centrifugation, une portion de M2 est ajoutée. Ces solutions appelées respectivement résidus a et b pour les Éch 1 et 2 sont agitées puis centrifugées, décantées et transférées.

Une portion de chaque solution de SN est diluée dans la M2 afin d'ajuster la concentration par rapport à l'étape A.

Analyse des résidus c et d des résidus a et b :

Aux résidus insolubles des solutions résidus a et b restant dans la fiole conique de centrifugation, une portion de M2 est ajoutée. Ces solutions appelées respectivement résidus c et d pour les résidus a et b sont agitées puis centrifugées, décantées et transférées. Une portion de chaque solution de SN est diluée dans la M2 afin d'ajuster la concentration par rapport à l'étape A.

Étape C :

La troisième étape consistait aussi à tester la matrice de l'échantillon choisi (produit 1) en ajoutant une quantité connue de std USP à la solution. Deux solutions identiques de M1 sont préparées à partir de la combinaison du produit 1 et du std USP. Elles sont agitées puis diluées avec de l'eau afin d'obtenir la M2. Ces solutions sont centrifugées, décantées et transférées. Ensuite, une portion de chaque solution de SN est diluée avec la M2 afin d'ajuster la concentration des SN par rapport aux étapes A et B. Pour ces solutions appelées Ens 1 et 2, des essais dans le temps (immédiatement, 24 h et 120 h) et par rapport à la température sont aussi effectués.

Procédures utilisées afin de doser les produits 1 à 7.

Solutions effectuées pour chaque produit :

Trois solutions identiques (1, 2 et 3) de M1 sont préparées pour les produits naturels commerciaux 1 à 6 et pour le Std USP (7). Elles sont agitées puis diluées avec de l'eau afin d'obtenir la M2. Ces solutions sont centrifugées pendant 10 minutes, décantées puis transférées complètement dans d'autres contenants. Ensuite, une portion de chaque solution de SN est diluée avec la M2 afin d'ajuster la concentration des SN par rapport aux étapes A, B et C. Les trois solutions de chaque produit (au total 21 solutions) sont injectées immédiatement. Deux solutions de Std 1 et 2 (Fluka) sont aussi injectées. Le Std 1 est exceptionnellement injecté six fois et le Std 2 est injecté au début et en fin de séquence.

